



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2017

**Marta Filipa
Godinho Maia**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MULTICAMADA
PARA LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS
ANTICANCERÍGENOS**



**Marta Filipa
Godinho Maia**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MULTICAMADA
PARA LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS
ANTICANCERÍGENOS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros, Investigadora Principal do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, Universidade de Aveiro, e da Doutora Carla Andreia Cunha Vilela, Investigadora de Pós-Doutoramento do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, Universidade de Aveiro.

Dedico esta dissertação aos meus pais.

o júri

Presidente

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Luísa Daniel da Silva

Investigadora Auxiliar do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro da Universidade de Aveiro

Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros

Investigadora Principal do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Doutora Carmen Freire e Doutora Carla Vilela, a oportunidade de realizar esta dissertação neste grupo de investigação, o que me permitiu adquirir uma enorme experiência, conhecimentos e crescimento profissional e pessoal. Agradeço também a orientação e apoio prestados, bem como a leitura desta dissertação e correções e sugestões sugeridas, sempre tendo em vista a melhoria deste trabalho.

Gostaria igualmente de agradecer a preciosa ajuda do Doutor Ricardo Pinto, pela sua partilha de conhecimentos e ainda pela obtenção das imagens de microscopia, essenciais para este trabalho.

Agradeço também aos investigadores Tiago Carvalho e Bruno Valente e ao doutorando Nuno Silva a ajuda na preparação das nanofibrilas de lisozima utilizadas neste trabalho, bem como o auxílio e esclarecimentos prestados sempre que necessário.

Agradeço à Marina, à Patrícia e à Sofia a companhia, o apoio e por tornarem o ambiente agradável no laboratório.

Agradeço a todos os elementos do grupo de investigação *LignoMacro*, pois todos, de uma forma ou de outra, contribuíram para tornar o tempo aqui passado no melhor possível.

Agradeço ainda ao Doutor Manuel Martins a ajuda prestada e por disponibilizar o seu laboratório e equipamentos sempre que necessário.

Não poderia deixar de agradecer à Nicole e à Ana Cristina, que no início desta dissertação eram colegas de mestrado mas que se tornaram nas melhores *amigas do lab e da hotte*, por todo o apoio prestado, por estarem sempre disponíveis a ajudar e por todos os momentos que passámos juntas.

Finalmente, embora venham no último parágrafo, são os mais importantes. Agradeço a Deus por ter estado sempre comigo, porque sem Ele alguns dos momentos teriam sido insuportáveis, e mesmo quando nem tudo corre bem, sei que “todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito” (Romanos 8:28) e que “tudo posso naquele que me fortalece” (Filipenses 4:13). Agradeço também profundamente aos meus pais, Fernanda e João, por todo o seu apoio incondicional, amor e carinho, porque sem eles eu não seria a pessoa que sou hoje, e também porque foram eles que sempre me incutiram os valores que tenho, o sempre querer trabalhar mais e melhor para chegar mais longe e alcançar os meus sonhos, e ainda pelas palavras de sabedoria em todos os momentos. Ao meu irmão Daniel agradeço o companheirismo e porque sem ele a vida não era a mesma coisa, e também pela compreensão sempre que ouviu um “agora não posso” ao longo de todo este percurso. À minha amiga Viviana agradeço também todo o apoio prestado, por ser um grande presente de Deus nesta etapa, por todos os nossos momentos e conversas, e porque mesmo estando longe sempre procurou estar mais perto.

A todos o meu muito obrigado!

palavras-chave

Sistemas multicamada, liberação controlada de fármacos, partículas, alginato, quitosano, nanofibrilas de lisozima, cancro, curcumina.

resumo

O cancro é a principal causa de morbilidade e mortalidade em todo o mundo e o seu tratamento atual, que inclui cirurgia para remoção do tumor, quimioterapia e/ou radioterapia, é bastante agressivo e apresenta inúmeros efeitos secundários, que por vezes são tão fortes que obrigam à interrupção do tratamento antes de se alcançar a erradicação do tumor. Portanto, surge a necessidade de pesquisa de novos fármacos, bem como de novas formas de administração/libertação dos mesmos. Por exemplo, os materiais funcionais nanoestruturados apresentam estruturas e propriedades melhoradas e têm surgido como uma alternativa em várias áreas, incluindo na liberação controlada de fármacos. Uma forma de obter esses materiais consiste na metodologia de adsorção camada-a-camada, a qual permite o desenvolvimento de partículas poliméricas multicamada que apresentam propriedades de liberação controladas com o consequente aumento da eficácia, especificidade, tolerância e índice terapêutico dos fármacos. Os biopolímeros têm ganho uma importância crescente na área biomédica, devido maioritariamente à sua biocompatibilidade e propriedades específicas. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho consistiu na preparação e caracterização de partículas poliméricas multicamada utilizando vários biopolímeros na sua construção, nomeadamente alginato, quitosano e nanofibrilas de proteínas, para a incorporação da curcumina (fármaco modelo).

Este sistema multicamada foi preparado mediante a utilização de um *template* de partículas de sílica modificadas (potencial zeta = $+96 \pm 2$ mV; diâmetro = 480 ± 8 nm) no qual foram depositadas camadas sucessivas de alginato e quitosano (com cargas opostas) até perfazer um total de 5 camadas, ou seja, alginato / quitosano / alginato / quitosano / alginato, e na sexta camada foram depositadas nanofibrilas de lisozima com diferentes razões de aspeto (quociente entre o comprimento e largura). A deposição de cada uma das camadas foi confirmada através da medição da reversão do potencial zeta correspondente à respetiva camada. A caracterização das partículas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) corroborou o sucesso da construção destes sistemas multicamada. Após a verificação da viabilidade de construção das partículas multicamada, a curcumina (fármaco modelo) foi incorporada com sucesso nas partículas de sílica modificadas (cerca de $61 \mu\text{g}$ de curcumina por mg de *template* de sílica) antes da deposição das camadas dos biopolímeros. O perfil de liberação da curcumina a partir das partículas multicamada foi estudado e os resultados preliminares evidenciam uma liberação controlada ao longo do tempo para as partículas com 6 camadas de biopolímeros.

keywords

Multilayered systems, controlled drug delivery, particles, alginate, chitosan, lysozyme nanofibrils, cancer, curcumin.

abstract

Cancer is the leading cause of morbidity and mortality worldwide and its current treatment, which includes surgery for tumor removal, chemotherapy, and/or radiation, is quite severe and has a number of side effects, which are sometimes so severe that the treatment must be interrupted before tumor eradication is achieved. Therefore, there is a need to research novel drugs, as well as novel systems for drug administration/delivery. For example, nanostructured functional materials have improved structures and properties and have emerged as an alternative in several areas, including in controlled drug delivery. One way to obtain these materials is by using the layer-by-layer adsorption methodology, which allows the development of multilayered polymeric particles with controlled release properties and consequent increase in efficacy, specificity, tolerance and therapeutic index of the drugs. Biopolymers have gained increasing importance in the biomedical field mainly due to their biocompatibility and specific properties. In this context, the objective of the present work consisted on the preparation and characterization of multilayered polymeric particles using various biopolymers in their construction, namely alginate, chitosan and protein nanofibrils, for the loading of curcumin (model drug).

This multilayered system was prepared using a modified silica particle template (zeta potential = $+96 \pm 2$ mV, diameter 480 ± 8 nm) in which successive layers of alginate and chitosan (with opposite charges) were deposited on a total of 5 layers, *i.e.*, alginate / chitosan / alginate / chitosan / alginate, and lysozyme nanofibrils with different aspect ratios (length to width ratio) were deposited as the sixth layer. The deposition of each of layer was confirmed by measuring the reversion of the zeta potential corresponding to each layer. The characterization of the particles by scanning electron microscopy (SEM) corroborated the success of the construction of these multilayered systems. After confirmation of the viability of the multilayered particle construction, curcumin (model drug) was successfully incorporated into the modified silica particles (about $61 \mu\text{g}$ of curcumin per mg of silica template) before the deposition of the biopolymers layers. The release profile of curcumin from the multilayered particles was studied and the preliminary results demonstrate a controlled release over time for the particles with 6 layers of biopolymers.

Índice

Contexto	1
1. Introdução.....	3
1.1. Cancro.....	3
1.2. Sistemas multicamada para libertação de fármacos	4
1.3. Nanocápsulas	8
1.4. Biopolímeros	10
1.4.1. Alginato	10
1.4.2. Quitosano.....	13
1.4.3. Nanofibrilas de proteína	16
2. Procedimento Experimental	20
2.1. Materiais e reagentes	20
2.2. Preparação do <i>template</i> de sílica	20
2.3. Preparação das nanofibrilas de lisozima.....	21
2.4. Preparação das partículas multicamada de biopolímeros	21
2.5. Incorporação da curcumina (fármaco modelo) nas partículas multicamada	22
2.6. Perfil de libertação da curcumina a partir das partículas multicamada: ensaios preliminares	23
2.7. Técnicas de caracterização	24
2.7.1. Potencial Zeta	24
2.7.2. pH	24
2.7.3. Microscopia Eletrónica de Varrimento.....	24
3. Resultados e discussão	26
3.1. Preparação e caracterização do <i>template</i> de sílica modificada.....	26
3.2. Preparação e caracterização das nanofibrilas de lisozima	28
3.3. Preparação e caracterização das partículas multicamada	29
3.3.1. Potencial zeta e pH	29
3.3.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento.....	32
3.4. Incorporação da curcumina (fármaco modelo) nas partículas multicamada	36
3.5. Perfil de libertação da curcumina a partir das partículas multicamada: ensaios preliminares	39

4. Conclusões e trabalho futuro	42
Referências Bibliográficas.....	44

Índice de Figuras

Figura 1 - Desenvolvimento de um tumor desde a carcinogénese inicial até à difusão limitada por tamanho máximo. Adaptado da referência (3).	3
Figura 2 - Representação esquemática da construção multicamada através de interações electrostáticas: (A) imersão do substrato carregado na solução poliónica correspondente, alternando com passos de lavagem; (B) representação esquemática da construção da arquitetura poliónica retratando a deposição começando, por exemplo, com um substrato carregado positivamente. As múltiplas imersões do substrato na solução poliónica correspondente permitem a construção de uma multicamada ao nível molecular (n camadas). Adaptado da referência (6).	6
Figura 3 - Métodos de deposição para a produção de sistemas camada-a-camada para libertação de fármacos. Os sistemas multicamada podem ser produzidos por <i>dipping</i> (A), <i>spraying</i> (B) e perfusão (C), entre outros. As representações encontram-se simplificadas. Adaptado da referência (5).	8
Figura 4 - Representação esquemática de nanopartículas poliméricas: nanocápsulas e nanoesferas. Adaptado da referência (26).	9
Figura 5 - Características estruturais do alginato: (A) conformação da cadeia e (B) monómeros de alginato. Adaptado das referências (41,47).	12
Figura 6 - Estrutura química do quitosano. Adaptado da referência (53).	13
Figura 7 - Imagem de Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM) das nanocápsulas de quitosano obtidas por Chen et al. Retirado da referência (61).	14
Figura 8 – Esquema ilustrativo da formação das fibrilas de proteína. Adaptado da referência (16).	16
Figura 9 - Imagem SEM das microcápsulas obtidas usando fibrilas de ovalbumina (A) e lisozima (B). Retirado da referência (17).	18
Figura 10 - Estrutura química da curcumina. Adaptado da referência (70).	18
Figura 11 - Esquema reacional da preparação das partículas de sílica modificadas.	27
Figura 12 - Micrografias de STEM e SEM das partículas de sílica modificadas. As imagens A e B foram captadas em modo STEM e as imagens C, D e E foram captadas em modo SEM. As ampliações utilizadas foram 10000× (A e C), 30000× (B e D) e 90000× (E).	27

Figura 13 - Micrografias de STEM recolhidas para as nanofibrilas de lisozima preparadas com DES (A) e com [Ch]Cl (B). A ampliação utilizada foi 30000× (A e B)... 29

Figura 14 - Preparação de partículas multicamada através do método camada-a-camada. Sobre as partículas de sílica modificadas (cinzento) é depositada a primeira camada, correspondente ao alginato (amarelo), seguida pela deposição do quitosano (vermelho). A deposição alternada destes dois biopolímeros continua até serem depositadas cinco camadas, terminando o processo com a deposição da sexta camada correspondente às nanofibrilas de lisozima (azul). 29

Figura 15 – Gráficos de potencial zeta versus número de camadas para as partículas utilizando sílica modificada como *template*. As camadas com número ímpar correspondem ao alginato e as com número par correspondem ao quitosano. A sexta camada corresponde às nanofibrilas de lisozima com diferentes razões de aspeto preparadas com diferentes agentes de fibrilação: DES (gráfico em cima) e [Ch]Cl (gráfico em baixo). 31

Figura 16 – Gráficos da variação de pH ao longo das seis deposições de polielectrólitos. As camadas com número ímpar correspondem ao alginato e as com número par correspondem ao quitosano. A sexta camada corresponde às nanofibrilas de lisozima com diferentes razões de aspeto preparadas com diferentes agentes de fibrilação: DES (gráfico em cima) e [Ch]Cl (gráfico em baixo). 32

Figura 17 - Micrografias de STEM recolhidas para as partículas revestidas com 3 camadas, sendo a última correspondente ao alginato. As ampliações utilizadas foram as seguintes: 10000× (A) e 30000× (B). 33

Figura 18 - Micrografias de STEM recolhidas para as partículas revestidas com 4 camadas, sendo a última correspondente ao quitosano. As ampliações utilizadas foram as seguintes: 10000× (A) e 30000× (B). 33

Figura 19 – Ampliação da quarta camada, revelando a morfologia da superfície das partículas multicamada. A micrografia foi recolhida em SEM utilizando uma ampliação de 90000×. 34

Figura 20 - Micrografias de SEM (A) e STEM (B) da quinta camada (alginato) das partículas multicamada utilizando uma ampliação de 10000× (A) e 40000× (B). 34

Figura 21 - Micrografias de STEM (A) e SEM (B, C e D) recolhidas para as partículas revestidas com 6 camadas, sendo a última correspondente às nanofibrilas de lisozima com

maior razão de aspeto (preparadas com DES). As ampliações utilizadas foram as seguintes: 20000× (A e B), 70000× (C) e 100000× (D)..... 35

Figura 22 - Micrografias de STEM (A) e SEM (B, C e D) recolhidas para as partículas revestidas com 6 camadas, sendo a última correspondente às nanofibrilas de lisozima com menor razão de aspeto (preparadas com [Ch]Cl). As ampliações utilizadas foram as seguintes: 60000× (A), 50000× (B), 70000× (C) e 150000× (D)..... 36

Figura 23 – Foto das partículas de sílica modificadas antes (A) e após (B, com sobrenadante e C, sem sobrenadante) a incorporação da curcumina, ilustrando a sua mudança de cor. 37

Figura 24 - Gráfico de potencial zeta versus número de camadas para as partículas cujo *template* contém curcumina. As camadas com número ímpar correspondem ao alginato e as com número par correspondem ao quitosano. A sexta camada corresponde às nanofibrilas de lisozima preparadas com o agente de fibrilação DES. 38

Figura 25 - Gráfico da variação de pH ao longo das seis deposições de polielectrólitos. As camadas com número ímpar correspondem ao alginato e as com número par correspondem ao quitosano. A sexta camada corresponde às nanofibrilas de lisozima preparadas com o agente de fibrilação DES..... 38

Figura 26 - Micrografias de SEM das partículas de sílica modificadas após incorporação da curcumina (A), e das camadas 5 (B) e 6 (C e D) das partículas multicamada. As ampliações utilizadas foram as seguintes: 70000× (A, B e C) e 130000× (D). 39

Figura 27 – Perfil de libertação cumulativa da curcumina no meio com tampão fosfato-citrato (pH 6) para as partículas de sílica modificadas e para as partículas multicamada com 5 e 6 camadas de biopolímeros (as linhas são apenas para orientação visual). 41

Contexto

O cancro consiste na principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, e prevê-se um aumento do número de novos casos ao longo das próximas décadas (1). Esta patologia apresenta como tratamento atual a cirurgia para remoção do tumor, quimioterapia e/ou radioterapia, no entanto estes procedimentos são muito agressivos apresentando inúmeros efeitos secundários, por vezes tão fortes que obrigam à sua interrupção antes de se alcançar a erradicação do tumor (2,3). Portanto, torna-se imperativa a pesquisa de novos fármacos, assim como de novas formas de administração / libertação destes, para que se possa proceder a uma entrega seletiva e localizada dos fármacos. Desta forma, serão administradas menores dosagens e a diminuição dos efeitos secundários será alcançada (2–4).

Os materiais nanoestruturados apresentam tipicamente propriedades melhoradas, e podem ser obtidos através da metodologia camada-a-camada (5–7). Esta permite a construção de diversas nanoestruturas, nomeadamente filmes planos, tubos e cápsulas. Atualmente, as cápsulas poliméricas representam um dos sistemas de libertação de fármacos mais promissores com vista à erradicação das células cancerígenas uma vez que exibem propriedades de libertação controladas, o que permite o aumento da eficácia, especificidade, tolerância e índice terapêutico dos fármacos (2,3,8–11). Assim, estas formulações tornam-se uma solução promissora para a administração de fármacos no tratamento do cancro e de outras doenças.

Neste contexto, os biopolímeros têm sido alvo de enorme interesse devido à sua biocompatibilidade e propriedades específicas (12), destacando-se neste trabalho o quitosano e o alginato. Estes dois biopolímeros têm sido largamente explorados em diversas combinações, para aplicações em sistemas de libertação de fármacos (12). Para além destes polissacarídeos, ainda se destacam neste trabalho as nanofibrilas de proteína. Estas nanofibrilas possuem elevada rigidez e resistência à degradação através de processos químicos, que são características favoráveis para a sua aplicação em materiais estruturais e na nanotecnologia, uma vez que a sua presença promove a melhoria das propriedades mecânicas dos materiais onde são utilizadas (13).

Assim, face ao exposto, o objetivo da presente dissertação consiste no desenvolvimento de sistemas multicamada utilizando biopolímeros na sua construção, nomeadamente alginato, quitosano e nanofibrilas de lisozima, e posterior incorporação de

curcumina, que é um polifenol hidrofóbico presente no açafrão, com grande potencial na prevenção e tratamento do cancro (1,14–19). As nanofibrilas são utilizadas com o fim de reforçar as partículas produzidas com alginato e quitosano, sendo esta a grande novidade que este trabalho trará, e a curcumina é usada como molécula modelo para testar a eficiência do sistema.

Nesta dissertação serão inicialmente apresentados os conceitos fundamentais para a compreensão desta temática, nomeadamente o porquê da necessidade da pesquisa de novos sistemas de administração / libertação de fármacos para o tratamento do cancro, os sistemas multicamada, a metodologia camada-a-camada, as cápsulas/partículas multicamada poliméricas, e o porquê do uso dos referidos biopolímeros neste trabalho. Seguidamente, apresentam-se os procedimentos realizados na produção dos materiais e na sua caracterização, seguindo-se o capítulo referente à apresentação e discussão dos resultados, terminando com as principais conclusões retiradas deste trabalho.

1. Introdução

1.1. Cancro

O cancro consiste num processo que ocorre devido à desregulação das vias de sinalização celular em múltiplas fases, o que conduz ao crescimento anormal de células, formando massas designadas por tumores (Figura 1) (2,14,19). Os tumores classificam-se em benignos ou malignos, tendo em conta se são autolimitantes ou não, o grau de agressividade e a capacidade de metastização (2). A transformação de uma célula normal numa célula cancerígena envolve três fases, nomeadamente, iniciação, promoção e progressão. As duas últimas dependem de diversos fatores, dos quais se destaca a angiogénese, que consiste num processo de formação de uma nova rede de vasos sanguíneos a partir dos vasos já existentes (2,19). A perda do controlo da proliferação/diferenciação celular e posterior invasão de órgãos e tecidos constitui a principal característica desta patologia (2).

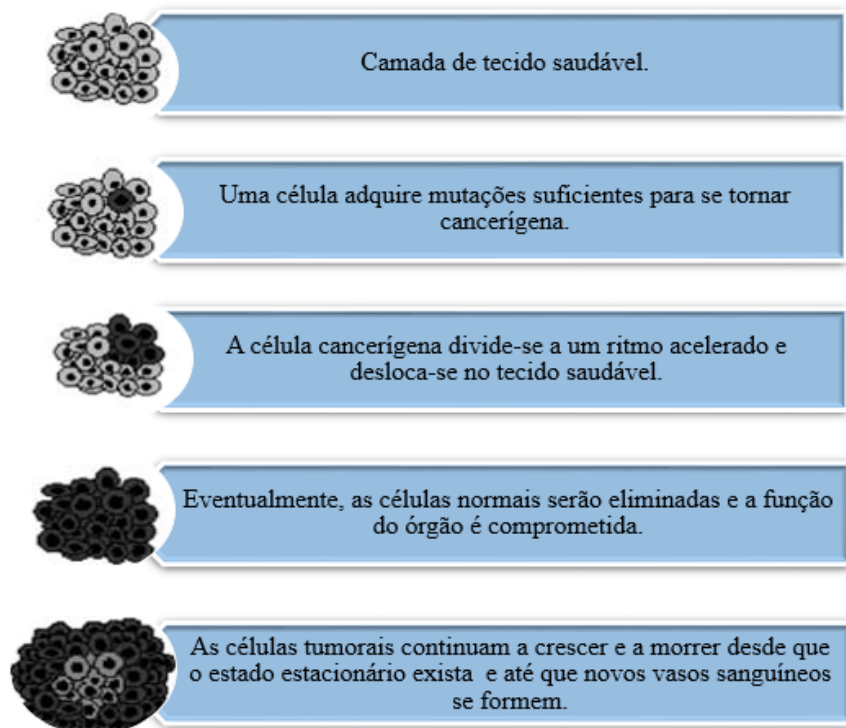


Figura 1 - Desenvolvimento de um tumor desde a carcinogénese inicial até à difusão limitada por tamanho máximo. Adaptado da referência (3).

Esta patologia é a principal causa de morbilidade e mortalidade em todo o mundo, e estima-se um aumento de cerca de 70% de novos casos ao longo das próximas décadas (1). Estudos demonstraram que os fatores genéticos são a causa de apenas 5-10% de todos os casos de cancro em humanos, sendo que a restante percentagem é resultado do estilo de vida (14). Os tipos de cancro mais frequentes variam com o género, idade, predisposição genética, fatores ambientais e estilo de vida (2). Assim, nos homens são mais comuns os cancros de pulmão, próstata, cólon/reto, cavidade oral, faringe, laringe, esófago, estômago, pelve renal (rins) e pele (melanoma), enquanto nas mulheres são mais prevalentes os de mama, leucemia, linfoma tipo não-*Hodgkin*, melanoma, tiróide, bexiga, rins, cólon/reto, ovário, colo do útero, cavidade oral e estômago (2).

O tratamento atual para o cancro inclui cirurgia para remoção do tumor e quimioterapia e/ou radioterapia (2,3). Contudo, muitas destas terapias são muito agressivas e apresentam inúmeros efeitos secundários, por vezes tão fortes que obrigam à interrupção do tratamento antes de se alcançar a erradicação do tumor (3). Para além disso, nem todos os tratamentos, mesmo que cumpridos de acordo com as indicações dos oncologistas, são totalmente efetivos. Atendendo a que a maioria dos fármacos usados no tratamento do cancro também afetam as células saudáveis, ou seja, apresentam falta de especificidade e de administração direcionada, torna-se imperativa a pesquisa de novos fármacos, mas em particular de novas formas de libertação destes, de forma a erradicar os tumores e simultaneamente afetar o mínimo possível as células normais (2,3,5).

1.2. Sistemas multicamada para libertação de fármacos

Como referido anteriormente, o processo de desenvolvimento de novos sistemas de libertação de fármacos deve ter em conta diversos fatores, tais como a toxicidade, biocompatibilidade, degradabilidade e controlo da libertação dos mesmos, com vista a uma administração segura e mais eficiente (5,20). Desta forma, poderá proceder-se a uma entrega seletiva e localizada dos fármacos, o que permite a administração de menores dosagens e, conseqüentemente, a diminuição dos efeitos secundários (4). Assim, a nanomedicina, conhecida também por nanotecnologia aplicada ao campo biomédico, tem vindo a tornar-se uma área de enorme interesse nas últimas décadas (21).

Os materiais funcionais nanoestruturados apresentam estruturas e propriedades melhoradas (6). A peça chave para o *design* e conceção destes materiais consiste no controlo

das suas propriedades de superfície (como polaridade, energia, carga, morfologia, topologia e rugosidade) e dos materiais usados. Uma destas abordagens consiste na metodologia camada-a-camada, que tem vindo a ser utilizada para a produção de diversos materiais nanoestruturados (7).

Esta metodologia foi sugerida, em 1966, por Iler, que descreveu pela primeira vez a produção de filmes com camadas múltiplas pela adsorção sequencial de partículas coloidais de cargas positivas e negativas (6). Contudo, apenas se tornou uma técnica de relevo após o trabalho de Decher e Hong, no início dos anos 90, que envolveu o desenvolvimento de sistemas multicamada de polielectrólitos. Tal desencadeou um elevado número de estudos com a finalidade de compreender e controlar os mecanismos de produção destes sistemas sob diferentes condições físicas e químicas, sendo ainda bastante atual o interesse nesta técnica (6,22).

O método de construção camada-a-camada tem por base a adsorção alternada de espécies complementares num substrato, através de interações electrostáticas ou não electrostáticas (6,23). No primeiro caso, são depositados alternadamente polielectrólitos sintéticos ou naturais, enquanto a segunda abordagem se baseia no estabelecimento de pontes de hidrogénio ou outras interações (22,23).

Na construção do material através de interações electrostáticas, ocorre uma deposição sequencial num substrato de polímeros carregados através de interações complementares (Figura 2 B) (24). As interações entre as espécies carregadas em solução e uma interface com carga oposta (Figura 2 A) são a chave para a estrutura final da camada/material. Durante o processo de montagem, a adsorção do polímero continua até que a carga superficial seja invertida, de modo a que a adsorção do ião de carga oposta prossiga num passo seguinte. Desta forma, camadas alternadas de polianiões e poliacatiões podem ser depositadas uniformemente e repetidas.

As interações electrostáticas são facilmente controladas pelo ajuste de diversos parâmetros físico-químicos, tais como pH, força iónica, espécies eletrolíticas, temperatura, tempo de adsorção e propriedades intrínsecas dos polielectrólitos (densidade da carga, concentração, arquitetura e peso molecular) os quais influenciam a estabilidade, estrutura interna, dinâmica, propriedades e modo de crescimento das multicamadas polielectrolíticas (6).

No geral, as interações electrostáticas são as mais exploradas e estudadas no âmbito da produção de sistemas multicamada. Contudo, as interações não electrostáticas também desempenham um papel importante na construção de materiais e crescimento adicional de materiais nanoestruturados devido à possibilidade de incorporar diversos materiais carregados ou não carregados, o que amplia as suas potenciais aplicações (6).

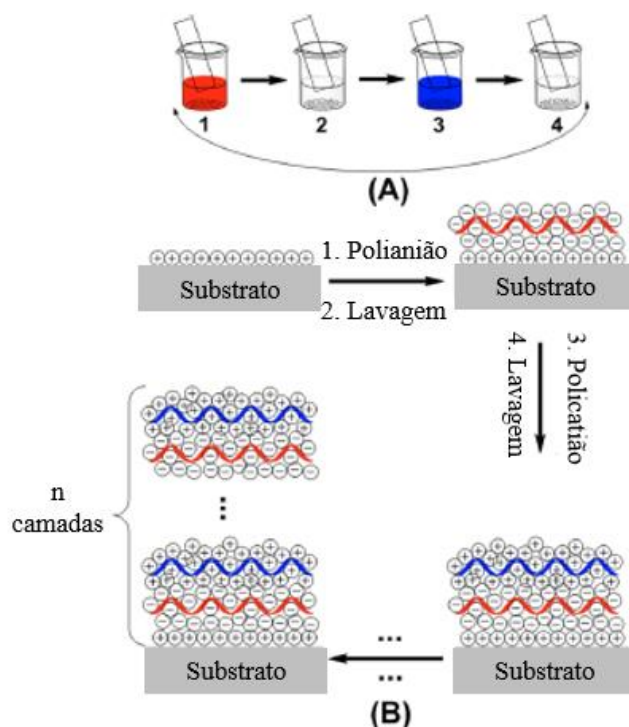


Figura 2 - Representação esquemática da construção multicamada através de interações electrostáticas: (A) imersão do substrato carregado na solução poliónica correspondente, alternando com passos de lavagem; (B) representação esquemática da construção da arquitetura poliónica retratando a deposição começando, por exemplo, com um substrato carregado positivamente. As múltiplas imersões do substrato na solução poliónica correspondente permitem a construção de uma multicamada ao nível molecular (n camadas). Adaptado da referência (6).

A metodologia camada-a-camada apresenta inúmeras vantagens. Consiste num método simples, eficiente, reproduzível, robusto, flexível e altamente versátil para modificar superfícies; permite a incorporação de uma enorme diversidade de blocos de construção (como polímeros sintéticos, péptidos, proteínas, nanotubos de carbono, argilas, óxidos metálicos, ácidos nucleicos, enzimas e vírus); pode ser desenvolvida à temperatura ambiente; o equipamento necessário é simples e barato; no geral, dependendo do polímero utilizado, não precisa de recorrer a solventes orgânicos e nocivos nem a condições agressivas

(temperaturas elevadas, valores extremos de pH), sendo por isso atrativo do ponto de vista ambiental e para fins biológicos; proporciona a incorporação de diversas biomoléculas; possibilita o controlo da composição do sistema pois permite a mudança na natureza dos blocos de construção que são incorporados em cada passo; a sua versatilidade permite ainda a construção de sistemas com a forma mais apropriada para o fim desejado; e pode incorporar moléculas pequenas ou grandes (5,6,20,22,23).

Devido às vantagens apresentadas, os sistemas camada-a-camada tornaram-se numa das principais tecnologias utilizadas em aplicações biomédicas, nomeadamente no desenvolvimento de sistemas para diagnóstico, revestimento de implantes médicos, em bioelectrónica, na entrega de genes, biomineralização, na engenharia de tecidos e na libertação de fármacos (6,22). Relativamente a esta última, estes sistemas permitem incorporar fármacos em conjuntos de camadas separadas, com potencial para libertação sequencial, sendo esta uma característica ímpar (23). Esta característica possibilita o uso desta técnica como via para alcançar a libertação controlada de fármacos (25). Para além disto, permite ainda a incorporação de várias moléculas de fármacos, sem o inconveniente da estabilidade que é comum em misturas simples, e a co-libertação de dois ou mais fármacos com diferentes perfis de libertação, devido à utilização de áreas compartimentadas (23).

A construção dos sistemas camada-a-camada pode ser desenvolvida por uma ampla variedade de métodos de deposição, na qual se incluem *dip – coating*, *spin – coating*, *spraying* e perfusão (Figura 3) (6). A mais utilizada é o *dip – coating*, visto que permite revestir substratos com geometrias complexas ou irregulares. Contudo, apresenta também desvantagens, pois cada passo de deposição é consideravelmente moroso (6). O *spin – coating* e, principalmente, os métodos camada-a-camada assistidos por *spraying* são alternativas que permitem reduzir o tempo e a quantidade de materiais necessários, tornando-se mais convenientes para aplicações industriais (6). Outros métodos de deposição promissores, tais como *dip – coating* hidrodinâmico, camada-a-camada assistida por *inkjet printing* e deposição camada-a-camada em partículas esféricas têm vindo a ser utilizados para a produção de conjuntos multicamadas com um aumento da eficiência do processo de montagem, tanto em sistemas bidimensionais como tridimensionais (6).

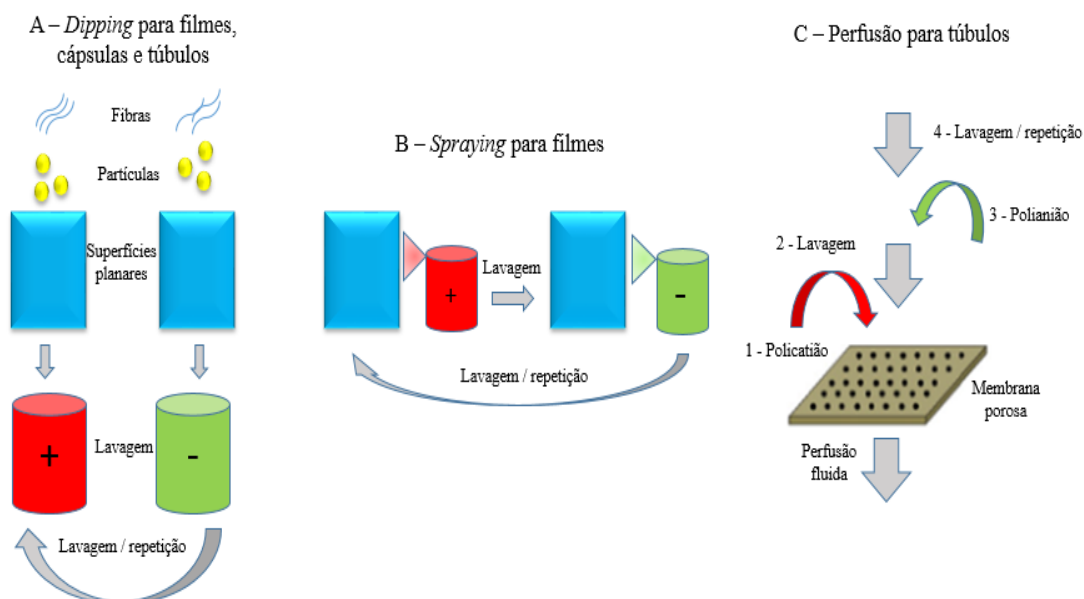


Figura 3 - Métodos de deposição para a produção de sistemas camada-a-camada para libertação de fármacos. Os sistemas multicamada podem ser produzidos por *dipping* (A), *spraying* (B) e perfusão (C), entre outros. As representações encontram-se simplificadas. Adaptado da referência (5).

A versatilidade da metodologia camada-a-camada permite a construção de diversas nanoestruturas, como filmes planos, tubos e cápsulas (5). As cápsulas multicamada são muito interessantes pelo seu potencial na libertação direcionada de fármacos no organismo, enquanto os filmes geralmente são utilizados no revestimento de sistemas biomédicos que envolvam a libertação prolongada de fármacos (por exemplo, implantes) ou sistemas de libertação dérmica ou transdérmica (20). No subcapítulo seguinte dar-se-á destaque à caracterização das nanocápsulas, dado que neste trabalho se pretendem desenvolver nanocápsulas biopoliméricas com vista à produção de um novo sistema para potencial aplicação na libertação controlada de fármacos para o tratamento do cancro.

1.3. Nanocápsulas

Neste domínio, as nanopartículas consistem em veículos de transporte sólidos de fármacos, com dimensões na escala nanométrica, que podem ser ou não biodegradáveis, apresentando o agente terapêutico de interesse encapsulado na sua matriz ou adsorvido ou conjugado na sua superfície (8,26,27). A designação nanopartícula é o nome coletivo atribuído a nanoesferas e nanocápsulas (Figura 4) (8).

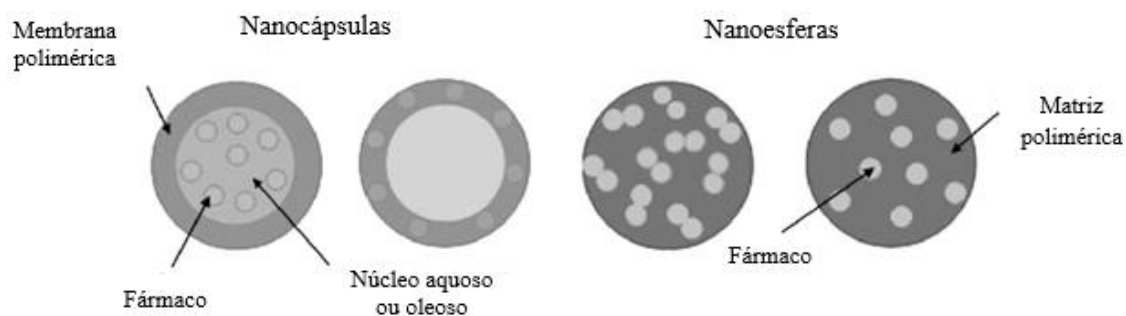


Figura 4 - Representação esquemática de nanopartículas poliméricas: nanocápsulas e nanoesferas. Adaptado da referência (26).

As nanoesferas são partículas sólidas esféricas, de tamanho nanométrico, que contêm fármacos adsorvidos na sua superfície ou encapsuladas no interior da matriz (8,26,28).

As nanocápsulas são sistemas vesiculares, de diâmetros compreendidos entre 1 a 100 nm, nos quais os fármacos se encontram armazenados numa cavidade, que consiste num núcleo interno líquido aquoso ou oleoso, rodeado por uma membrana polimérica (Figura 4) (8,9,29,30). Neste caso, as substâncias ativas estão normalmente dissolvidas no núcleo. Para além desta forma de armazenamento, as substâncias podem estar também adsorvidas na superfície da cápsula (8). As nanocápsulas são, assim, consideradas como um sistema reservatório (29,30).

As nanocápsulas podem ser obtidas por seis métodos de produção distintos, nomeadamente, nanoprecipitação, emulsão-difusão, dupla emulsificação, emulsão-coacervação e camada-a-camada (9).

As nanocápsulas obtidas pela metodologia camada-a-camada são normalmente produzidas alternando camadas de polímeros carregados (31). Este método permite o controlo da dimensão, composição, porosidade, estabilidade, funcionalidade da superfície e estabilidade coloidal das nanocápsulas (10). Dependendo dos polímeros usados, estas podem ainda ser biodegradáveis e apresentar baixa citotoxicidade para os sistemas biológicos (31). As nanocápsulas, para além de serem utilizadas na libertação direcionada e controlada de fármacos, podem ser igualmente usadas na entrega de genes, em biossensores, entre outras aplicações (5).

A nanoencapsulação de fármacos pela metodologia camada-a-camada permite o aumento da eficácia, especificidade, tolerância e índice terapêutico dos mesmos (32). O

número de camadas utilizadas atua como uma ferramenta de controlo da permeabilidade da cápsula, bem como na retenção do fármaco e nas suas taxas de degradação e libertação (11). As nanocápsulas multicamada apresentam uma enorme versatilidade em termos de formulação, libertação controlada e dimensão sub-celular, para além de modificarem as características físico-químicas do fármaco (o que resulta numa alteração da sua farmacocinética e farmacodinâmica), protegerem o fármaco da libertação / degradação prematura e interação com o ambiente biológico, aumentarem o tempo de retenção, melhorarem a penetração intracelular e a adsorção no tecido alvo e permitirem o uso de várias vias de administração (26,32–34). As nanocápsulas poliméricas multicamada são um dos sistemas de libertação de fármacos mais promissores com vista à erradicação das células cancerígenas (2,3).

Diversos biopolímeros têm sido empregues na sua produção, e em combinações variadas, podendo referir-se como exemplo, quitosano, alginato, heparina, protamina, pectina e fucoidano (12,35–40).

1.4. Biopolímeros

Os polímeros provenientes de fontes naturais, vulgarmente designados por biopolímeros, têm uma longa história enquanto biomateriais, sendo estes definidos como materiais que interagem com os sistemas biológicos com o objetivo de avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (41). Os biopolímeros são alvo de grande interesse devido à sua biodegradabilidade, baixa citotoxicidade e biocompatibilidade (25), sendo exemplos o alginato, o quitosano e as fibrilas de proteína, os quais serão utilizados neste trabalho.

1.4.1. Alginato

O alginato, um biopolímero aniónico, pode ser extraído de algas ou de bactérias (41–45). O alginato disponível comercialmente é essencialmente obtido a partir de algas castanhas, tais como *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*, maioritariamente por processos de extração alcalina (41,42,44). As algas são recolhidas, secas e sujeitas a vários pré-tratamentos químicos com vista à remoção de impurezas (como metais pesados,

endotoxinas, proteínas, polifenóis) frequentemente presentes (42). De seguida, é realizada uma filtração, sendo posteriormente adicionado cloreto de sódio ou de cálcio para precipitar o alginato (41). O alginato pode ainda ser tratado com ácido clorídrico diluído, obtendo-se ácido algínico. Após purificação adicional produz-se pó de alginato de sódio solúvel em água.

A biossíntese bacteriana também permite a obtenção de alginato, contudo, esta via não é viável para aplicações comerciais, uma vez que os preços dos alginatos obtidos a partir de algas marinhas são mais baixos, sendo confinada essencialmente a estudos de pesquisa (41,42,46). Neste caso, o alginato é produzido a partir de *Azotobacter* e *Pseudomonas* (41,42,44). A via da biossíntese do alginato é geralmente dividida em quatro passos, nomeadamente, síntese do substrato precursor (onde ocorre a biossíntese de ácido GTP-manurónico no interior do citosol da célula bacteriana), polimerização e transferência através da membrana citoplasmática (envolve a transferência do precursor citosólico ácido GTP-manurónico através da membrana citoplasmática e polimerização dos monómeros em polimanuronato), transferência periplasmática e modificação (na qual ocorre transacetilação dos grupos hidroxilo na posição C2 e/ou C3 do ácido manurónico evitando que estes resíduos sejam epimerizados em ácido glucorónico e sejam degradados pela alginato liase, no periplasma), e exportação através da membrana plasmática (o alginato é exportado pela porina AlgE, que forma um poro seletivo para aniões, atravessando a membrana externa) (41,46).

Quanto à sua estrutura, os alginatos são uma família de polissacarídeos lineares que contêm quantidades variáveis de resíduos de ácido β -D-manurónico (blocos M) e ácido α -L-gulurónico (blocos G) ligados por ligações glicosídicas β -1,4 (41–45,47). A fonte natural do alginato influencia a razão entre os blocos de manuronato e guluronato, assim como o comprimento de cada bloco, o que permite a ocorrência de diferentes alginatos (41). Estes resíduos de isómeros conformacionais diferem no seu arranjo estrutural e por isso formam três formas diferentes de segmentos de polímero (41,42,44). Assim, estão presentes blocos constituídos por resíduos G consecutivos (GGGG), por resíduos M consecutivos (MMMM), e por regiões alternadas de segmentos M e G (GMGM) (Figura 5 B).

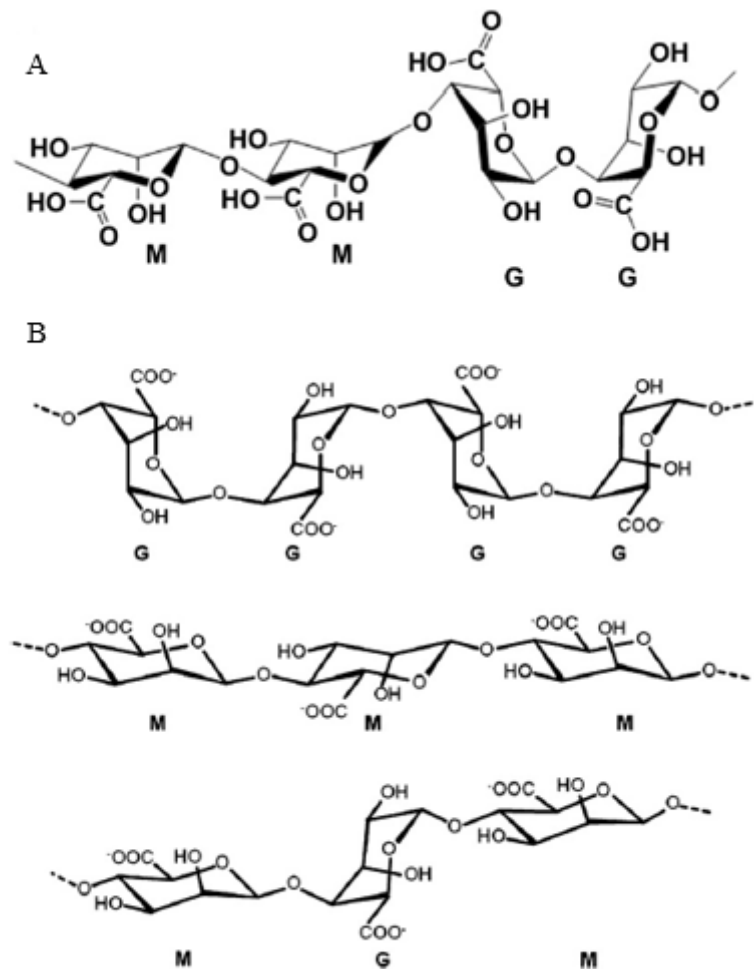


Figura 5 - Características estruturais do alginato: (A) conformação da cadeia e (B) monómeros de alginato. Adaptado das referências (41,47).

A composição química e a sequência das várias unidades constituintes do alginato podem variar entre as espécies de algas e mesmo entre diferentes partes da alga, e ainda consoante a época do ano em que são extraídos (45). A composição e a extensão das sequências de diferentes blocos e o peso molecular determinam as propriedades físicas dos alginatos (44).

Em geral, este biopolímero apresenta biocompatibilidade, baixa toxicidade, custo relativamente baixo, gelificação pela adição de cátions divalentes como Ca^{2+} , permite a formação de géis, não é imunogénico e é biodegradável (41,43). O alginato tem ganho uma importância crescente em cuidados de saúde e na indústria farmacêutica, sendo também usado em diversas áreas como imobilização celular, engenharia de tecidos, e libertação controlada de fármacos (41–43). Em particular, este biopolímero tem sido largamente

explorado em várias aplicações de liberação de fármacos em combinação com quitosano, cuja combinação forma complexos iônicos (41).

Diversos estudos foram realizados utilizando alginato na produção de nanocápsulas, podendo ser citado como exemplo o estudo de Lertsutthiwong *et al.* (48). Neste trabalho foram preparadas nanocápsulas de alginato com vista à encapsulação de óleo de curcuma, que é bastante volátil. Apesar de se ter verificado alguma perda de óleo durante o procedimento, devido à referida volatilidade, o alginato demonstrou ser um biopolímero eficaz para a encapsulação de fármacos voláteis e as nanocápsulas produzidas mantiveram a estabilidade física durante armazenamento prolongado a 4 °C.

1.4.2. Quitosano

O quitosano é, em meio ligeiramente ácido, um polissacarídeo catiónico que é obtido através da desacetilação da quitina (um polissacarídeo natural), sendo esta última o segundo polissacarídeo mais abundante depois da celulose (49–56). A quitina obtém-se, por exemplo, a partir do exosqueleto de crustáceos (casca de camarões, caranguejos, lagostins, lagostas) e da parede celular de alguns fungos, como *Mycelia*, *Aspergillus* e *Mucor* (51–53,55,56).

O quitosano consiste num polímero linear constituído por unidades de (1→4)-2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucose (N-acetil-D-glucosamina, NAG) e (1→4)-2-amino-2-deoxi- β -D-glucose (D-glucosamina), ligadas por ligações glicosídicas β -1,4 e contendo grupos amina e grupos hidroxilo (figura 6) (49,52–54,56,57). Os grupos amina permitem que o quitosano interaja com superfícies ou polímeros carregados negativamente (53).

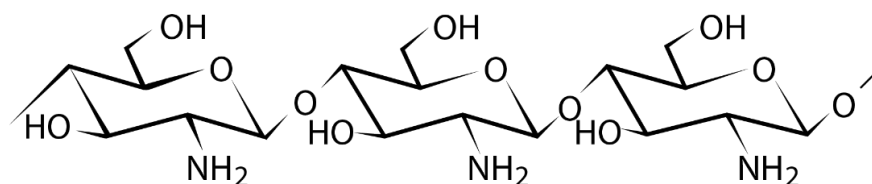


Figura 6 - Estrutura química do quitosano. Adaptado da referência (53).

Existem diversos quitosanos, que diferem no tamanho (massa molecular média) e grau de desacetilação, e a sua diversidade é ampliada pelas modificações químicas que têm vindo a ser estudadas, formando os derivados de quitosano (50). O grau de desacetilação representa a proporção entre as unidades de D-glucosamina e a soma de ambas as unidades D-glucosamina e NAG (52). A densidade, viscosidade, grau de desacetilização e peso

molecular do quitosano são características que influenciam as propriedades das formulações farmacêuticas baseadas neste polímero (53). No estado sólido, o quitosano apresenta-se como um polímero semicristalino (58).

O quitosano é um biopolímero versátil e apresenta excelentes propriedades, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa citotoxicidade (50,51). Com base nestas propriedades, este polímero apresenta grande potencial para o uso em produtos de cuidados de saúde, sendo aplicado na libertação de fármacos e engenharia de tecidos (50). O quitosano permite o controlo da libertação de agentes ativos e evita o uso de solventes orgânicos perigosos durante o fabrico de partículas, pois é solúvel em soluções aquosas ácidas e apresenta carácter polielectrolítico, sendo amplamente utilizado no desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos, como por exemplo nanopartículas e filmes, bem como na produção de hidrogéis, géis e fibras (54,58,59).

Diversos estudos foram realizados utilizando quitosano na produção de nanocápsulas, podendo citar-se a título de exemplo o estudo de Chen *et al.* (60,61), no qual foram produzidas nanocápsulas de quitosano responsivas ao pH (figura 7) com o objetivo de encapsular doxorrubicina. Os tumores apresentam um microambiente mais ácido (com valores de pH de 5,7) do que as células normais, devido à acumulação de ácido láctico resultante do metabolismo anaeróbico da glicose. Uma vez que a libertação do fármaco depende do pH, as nanocápsulas atuaram no local do tumor, ocorrendo assim uma libertação seletiva, o que diminuiu os efeitos adversos resultantes destes fármacos. Desta forma, estas nanocápsulas apresentaram benefícios para administração de fármacos anti-cancerígenos hidrofóbicos.

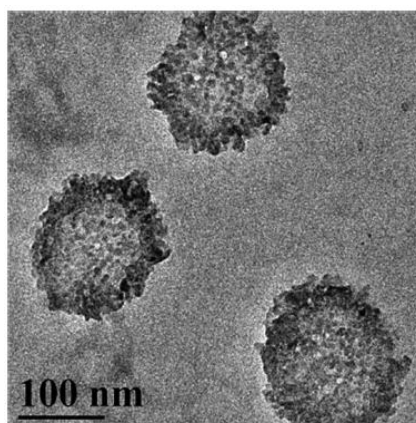


Figura 7 - Imagem de Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM) das nanocápsulas de quitosano obtidas por Chen *et al.* Retirado da referência (61).

Como referido anteriormente, o quitosano e o alginato têm vindo a ser utilizados em conjunto em várias aplicações para libertação de fármacos, sendo uma delas a produção de nanocápsulas camada-a-camada. Vários estudos têm vindo a ser realizados, podendo citar-se como exemplos os trabalhos de Feng *et al.* (62), Rivera *et al.* (35) e Ye *et al.* (36).

Feng *et al.* (62) produziram nanocápsulas de quitosano e alginato responsivas ao pH, utilizando nanopartículas de sílica como *template*, encapsulando doxorrubicina, com vista ao estudo da sua eficiência de libertação, internalização celular e biodistribuição. Os resultados obtidos mostraram que a libertação é mais rápida a um pH baixo e a avaliação das células HeLa *in vitro* mostraram que estas nanocápsulas fornecem uma libertação de doxorrubicina intracelular controlada e uma acumulação prolongada do fármaco no núcleo, o que resulta numa eficácia terapêutica prolongada. Os estudos de biodistribuição em ratos saudáveis mostraram que estas nanocápsulas apresentavam um tempo de circulação sistémica mais longo e uma taxa de eliminação plasmática mais lenta do que a doxorrubicina “livre”, e os resultados histológicos indicaram que as nanocápsulas tinham boa compatibilidade com os tecidos. Assim, estas nanocápsulas multicamada apresentam potencial como veículos seguros de fármacos.

Rivera *et al.* (35) produziram nanocápsulas ocas multicamada utilizando alginato e quitosano e nanopartículas de poliestireno como *template*, para encapsulação de compostos bioativos, usando como compostos modelo: glicomacropéptido e ácido 5-aminosalicílico (incorporados em separado). Neste caso, o composto modelo foi depositado entre camadas, tendo-se verificado que, para além de esta forma de incorporação não afetar nem a integridade nem a estrutura das nanocápsulas, ainda permitiu uma maior proteção do fármaco, o que poderá ser uma alternativa à forma tradicional de encapsulação. Assim, os resultados obtidos demonstraram que a morfologia esférica e uma boa capacidade de encapsular compostos bioativos tornam estas nanocápsulas promissoras como veículos de fármacos.

Por fim, Ye *et al.* (36) produziram também nanocápsulas multicamada utilizando quitosano e alginato como polielectrólitos e poliestireno enquanto *template*, sendo estudadas as propriedades de encapsulação e libertação de cloridrato de acridina, usada como composto hidrofílico modelo. As nanocápsulas produzidas tinham uma boa integridade e os biopolímeros escolhidos, por terem uma estrutura química semelhante, permitiram uma

melhor deposição das camadas. Os resultados obtidos nos ensaios elaborados demonstraram que estas nanocápsulas têm uma aplicação potencial na liberação controlada de fármacos.

1.4.3. Nanofibrilas de proteína

A agregação proteica consiste num processo complexo e demorado, no qual se formam estruturas complexas que vão desde dímeros a fibrilas altamente estruturadas (63). A agregação das proteínas solúveis resulta na formação de estruturas longas conhecidas por fibrilas de amilóide ou simplesmente nanofibrilas de proteínas (13,63).

Estas nanofibrilas são caracterizadas por uma estrutura de folhas β onde as cadeias β assentam perpendicularmente ao eixo da fibrila (63). São normalmente formados por duas ou mais folhas β que se agregam lateralmente. Esta estrutura é designada por β cruzada, devido ao seu padrão característico de difração de raios X. As sequências de proteínas que formam fibrilas de proteína sob condições fisiológicas apresentam alta hidrofobicidade, alta propensão a formar folhas β e carga reduzida.

As fibrilas de proteína exibem quiralidade e polaridade combinadas ao longo do eixo principal (64). São estruturas proteicas auto-construídas, altamente estáveis, insolúveis e heterogêneas (15,65). As folhas β antiparalelas são mantidas juntas por ligações π adjacentes entre os anéis de fenilalanina e interações eletrostáticas entre pares carregados (ácido glutâmico-lisina), o que controla e estabiliza a estrutura. (15) As fibrilas de proteína são constituídas por vários filamentos (4 a 6), de torção helicoidal em torno do eixo da fibrila. No entanto, antes dos filamentos ou fibrilas se formarem (com alguns micrómetros de comprimento), são formadas estruturas mais curtas e menos ordenadas (200 nm), designadas por protofibrilas, que constituem as suas unidades básicas (figura 8).

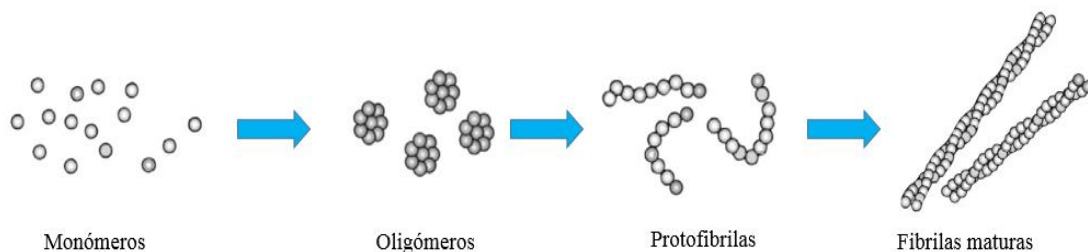


Figura 8 – Esquema ilustrativo da formação das fibrilas de proteína. Adaptado da referência (16).

A propensão de um polipéptido para formar nanofibrilas depende de vários fatores incluindo carga do polipéptido, sequência, hidrofobicidade e estrutura secundária (65). A cinética deste processo inclui três estágios característicos, nomeadamente, fase de latência, fase de crescimento e patamar final (63). Na fase de latência um grande número de núcleos primários são construídos a partir de monómeros em solução. Para a fase de crescimento, são propostos vários modelos cinéticos. O mais simplista, que pressupõe um crescimento linear na extremidade da fibrila subestima a autocatálise extrema e forte dependência da concentração de autoconstrução de proteína, originando uma acumulação exponencial de massa durante a fase de agregação inicial observada para muitas proteínas. Outros modelos cinéticos capazes de explicar a taxa de crescimento exponencial envolvem a nucleação secundária onde a superfície da fibrila leva à construção de novos oligómeros; fragmentação, na qual as fibrilas quebram e como tal fornecem novas extremidades para alongação; e bifurcação, onde as fibrilas começam a ramificar-se.

Algumas fibrilas de proteína apresentam funções fisiológicas diversificadas, que podem ser encontradas em quase todos os reinos, como armazenamento de péptidos, função estrutural, formação de melanina ou de biofilmes (63). Por outro lado, a rigidez e força das fibrilas de proteína combinadas com o elevado nível de resistência à degradação através de processos químicos são características favoráveis para aplicação em materiais estruturais (65). A presença de fibrilas de proteína promove a melhoria das propriedades mecânicas do material onde são utilizadas. Ou seja, estas fibrilas apresentam uma combinação única de composição química e robustez mecânica, o que possibilita múltiplas aplicações possíveis em nanotecnologia e biomateriais funcionais artificiais. De facto, estas especificidades tornam as fibrilas de proteína interessantes para inúmeras aplicações e representam uma área emergente e dinâmica de pesquisa, nomeadamente como plataformas de libertação controlada de fármacos, componentes em compósitos bioativos, sensores e materiais funcionais biomiméticos (63,64).

Neste trabalho, as fibrilas de proteína serão usadas na produção das partículas poliméricas multicamada, como forma de reforço destas. Esta será a grande novidade deste trabalho, atendendo a que à data da sua elaboração, não existiam ainda estudos referentes à incorporação de nanofibrilas de proteína em partículas multicamada de quitosano e alginato. O único estudo existente referente à incorporação de nanofibrilas em cápsulas corresponde ao trabalho desenvolvido por Humblet-Hua *et al.* (17), no qual foram produzidas

microcápsulas multicamada reforçadas com fibrilas de proteínas, nomeadamente ovalbumina e lisozima (Figura 9). Um outro estudo realizado por Majorosova *et al.* (18), reporta o uso de fibrilas de proteína em nanopartículas, contudo estas não são partículas multicamada.

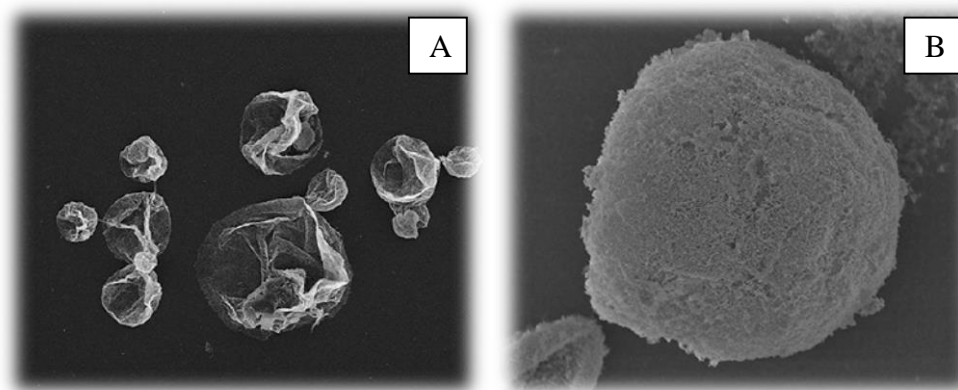


Figura 9 - Imagem SEM das microcápsulas obtidas usando fibrilas de ovalbumina (A) e lisozima (B). Retirado da referência (17).

Assim, e como referido anteriormente, o objetivo do presente trabalho consiste no desenvolvimento de partículas multicamada utilizando biopolímeros na sua construção, nomeadamente alginato, quitosano e nanofibrilas de lisozima. Para testar a eficiência do sistema desenvolvido, utilizar-se-á a curcumina como molécula modelo.

A curcumina (1,7-bis (4-hidroxil-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona ou diferuloilmetano (Figura 10), um pigmento amarelo, é um polifenol hidrofóbico presente no açafrão, extraído do rizoma da planta *Curcuma longa* (1,2,14,19,66–69). A curcumina é insolúvel em água e éter, mas solúvel em etanol, dimetilsulfóxido e acetona, apresenta um ponto de fusão de 183 °C, fórmula molecular de $C_{21}H_{20}O_6$ e peso molecular de 368,37 g mol⁻¹ (66,68,69).

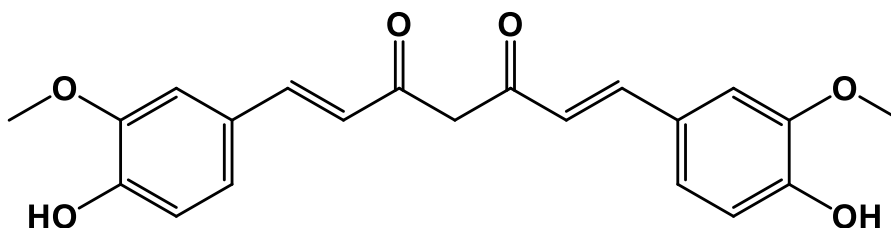


Figura 10 - Estrutura química da curcumina. Adaptado da referência (70).

A curcumina possui potencial clínico no tratamento de uma grande diversidade de doenças crônicas, incluindo cancro, doenças cardiovasculares, inflamatórias, metabólicas, neurológicas, de pele e em várias doenças infecciosas, possuindo ainda propriedades antimicrobianas (1,67). A curcumina exibe potencial terapêutico *in vitro* contra diversos tipos de cancro, nomeadamente, linfoma, cancro gastrointestinal, pancreático, hepático, da bexiga, geniturinário, da mama, do ovário, da próstata e do pulmão (14,19,68,69).

A curcumina pode suprimir a transformação, proliferação e a metástase dos tumores (68). Estes processos são mediados através da regulação de vários fatores de transcrição, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, cinases e outras enzimas, que consistem nos alvos moleculares da curcumina (1,14,19,66,68–70). Ainda inibe a proliferação de células, mantendo-as em determinadas fases do ciclo celular e induzindo a apoptose (68).

2. Procedimento Experimental

Neste capítulo são descritos os materiais e reagentes utilizados e todos os procedimentos realizados ao longo do trabalho. No último subcapítulo são apresentadas as técnicas de caracterização dos materiais de partida (partículas de sílica modificadas, alginato, quitosano e nanofibrilas de lisozima), bem como dos materiais desenvolvidos (partículas multicamada).

2.1. Materiais e reagentes

O alginato (sal de sódio de ácido algínico proveniente de algas castanhas), o 3-aminopropiltri-etoxisilano (APTES, pureza $\geq 98\%$), o cloreto de colina (pureza $\geq 98\%$), o tetraetoxisilano (TEOS, pureza 98%), a glicina (pureza $\geq 98,5\%$), a curcumina (pureza $\geq 65\%$) e o fosfato de sódio dibásico anidro (pureza $\geq 99\%$) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O quitosano, com um peso molecular de 15 kDa e um grau de desacetilação superior a 85% foi fornecido pela Polysciences, Inc. A lisozima proveniente de clara de ovo de galinha (atividade de ~ 70000 U mg^{-1}) foi fornecida pela Fluka. O etanol absoluto anidro foi adquirido à Carlo Erba Dasigroup e o ácido acético glacial (pureza 99-100%) foi fornecido por Chem-Lab. O ácido cítrico anidro (pureza 99,6%) foi adquirido à Acros Organics. A água ultrapura foi obtida através de um sistema Milli-Q Simplicity UV Tipo 1 da Millipore.

2.2. Preparação do *template* de sílica

O *template* de sílica (SiO_2) foi preparado tendo por base o trabalho de Pinto *et al.* (71). Assim, 2,25 mL de TEOS foram adicionados a um erlenmeyer contendo 42,5 mL de etanol, 4,5 mL de água desionizada e 0,75 mL de hidróxido de amónio, sob agitação constante. A reação decorreu durante 24 horas, à temperatura ambiente, sob agitação moderada. As partículas de sílica foram recolhidas por centrifugação, lavadas uma vez com etanol e duas com água ultrapura e, finalmente, secas numa estufa a 50 °C durante 24 horas.

As partículas de sílica preparadas foram posteriormente funcionalizadas com grupos amina, tendo por base o trabalho de Liu *et al.* (72). Assim, colocaram-se 200 mg destas partículas (em pó) num erlenmeyer, adicionaram-se 40 mL de etanol, e colocou-se a mistura num banho de ultrassons por 30 minutos, com vista a assegurar a dispersão completa da

sílica. De seguida, adicionaram-se 100 μL de APTES e deixou-se em agitação magnética durante 12 horas. As partículas de sílica amino-modificadas foram então sujeitas a um processo de purificação, por centrifugação a 6000 rpm durante 10 minutos e re-dispersão em etanol, que se repetiu três vezes. Note-se que, após cada lavagem e posterior adição de etanol, as referidas partículas foram colocadas num banho de ultrassons, para promover a sua lavagem e uma boa dispersão no etanol. No final, as partículas foram re-dispersas em água ultrapura e guardadas no frigorífico até à sua utilização.

2.3. Preparação das nanofibrilas de lisozima

A preparação das nanofibrilas de lisozima teve por base o trabalho de Silva *et al.* (73). Assim, começou-se por preparar o solvente eutéctico profundo (DES), [Ch]Cl:Ac, misturando os dois componentes, nomeadamente o cloreto de colina ([Ch]Cl) e o ácido acético (Ac), numa proporção molar de 1:1, triturando-os num almofariz com um pilão, à temperatura ambiente, até formar um líquido homogéneo.

A lisozima proveniente de clara de ovo de galinha foi dissolvida (2 mg mL^{-1}) numa solução tampão de ácido clorídrico 10 mM a pH 2 com 20 mM de glicina e com 5% (v/v) de [Ch]Cl ou DES ([Ch]Cl:Ac) como agente de fibrilação. As amostras foram incubadas a 70 °C num banho de óleo, sob agitação magnética. As nanofibrilas de lisozima obtidas foram separadas por centrifugação a 6000 rpm, durante 30 minutos, usando uma centrífuga Megafuge 16R da Thermo Scientific. Os sobrenadantes foram trocados com água ultrapura Milli-Q. O passo de separação foi repetido por duas vezes. As nanofibrilas de lisozima preparadas com os dois agentes de fibrilação distintos foram armazenadas no frigorífico até à sua utilização.

2.4. Preparação das partículas multicamada de biopolímeros

Com vista à preparação das partículas multicamada, começou-se por preparar as soluções dos polielectrólitos, nomeadamente, o alginato dissolvido em água ultrapura (2 mg mL^{-1}) e o quitosano numa solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) (2 mg mL^{-1}). O pH de cada solução foi ajustado para 6 no caso do alginato e para 3 no caso do quitosano.

As partículas de sílica modificadas dispersas em água ultrapura (1,5 mL) foram centrifugadas a 6000 rpm durante 5 minutos, numa centrífuga Rotofix 32A Hettich Zentrifugen, e o sobrenadante foi substituído por uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v). De seguida, estas partículas foram colocadas num banho de ultrassons durante 15 minutos para assegurar a sua dispersão completa.

O processo de revestimento das partículas de sílica modificadas com os biopolímeros teve início com a adição gota-a-gota de 5 mL de alginato à dispersão das partículas de sílica modificadas, com agitação durante 15 minutos. Seguidamente, a dispersão foi centrifugada a 6000 rpm durante 5 minutos, após os quais se efetuou o processo de lavagem com água ultrapura, que foi repetido duas vezes para garantir a remoção do excesso de polielectrólito.

Esta metodologia foi repetida para a deposição da camada de quitosano, contudo usando uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) no processo de lavagem, ao invés de água ultrapura. Este procedimento foi repetido até ser atingido o número desejado de camadas (5 camadas). As nanofibrilas de lisozima com diferentes razões de aspeto foram incorporadas na camada número 6 das partículas seguindo o procedimento descrito para a deposição do quitosano. De notar que toda a metodologia foi realizada à temperatura ambiente.

2.5. Incorporação da curcumina (fármaco modelo) nas partículas multicamada

A curcumina foi incorporada nas partículas multicamada antes da sua construção, ou seja, foi previamente adsorvida nas partículas de sílica modificadas antes da deposição das camadas dos biopolímeros (alginato, quitosano e nanofibrilas de lisozima). Tendo por base os trabalhos de Kim *et al.* (74) e Taebnia *et al.* (75), 4 mg de curcumina foram dissolvidas em 2 mL de etanol, e 40 mg de sílica modificada foram adicionados de seguida. Esta mistura foi colocada sob agitação magnética suave durante 24 horas. As partículas de sílica modificadas contendo a curcumina foram posteriormente separadas por centrifugação a 6000 rpm durante 5 minutos, e sujeitas a um processo de lavagem com etanol, durante o qual as partículas foram dispersas neste solvente e novamente centrifugadas. Este processo de lavagem foi repetido duas vezes. Após término das lavagens, as partículas de sílica modificadas contendo curcumina foram dispersas numa solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) e prosseguiu-se com o procedimento de deposição das camadas dos biopolímeros tal como descrito no subcapítulo 2.4.

A incorporação de curcumina nas partículas de sílica modificadas foi quantificada por espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis, Shimadzu UV-1800) através da medição da absorvância a 430 nm dos sobrenadantes e fazendo uso de uma reta de calibração ($y = 0,1555x - 0,0112$; $R^2 = 0.987$) estabelecida a partir de soluções de concentrações conhecidas de curcumina em etanol ($0.5\text{--}5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$). A percentagem de incorporação da curcumina (fármaco modelo) foi calculada tendo por base a seguinte equação:

$$\text{Incorporação (\%)} = \frac{\text{massa total CUR} - \text{massa CUR sobrenadante}}{\text{massa total CUR}} \times 100$$

2.6. Perfil de libertação da curcumina a partir das partículas multicamada: ensaios preliminares

Ensaio preliminares para avaliar o perfil de libertação da curcumina a partir das partículas multicamada (6 camadas: alginato / quitosano / alginato / quitosano / alginato / nanofibrilas de lisozima preparadas com DES) foram efetuados com base no procedimento descrito por Taebnia *et al.* (75) com ligeiras modificações. Para efeitos comparativos, a libertação da curcumina a partir das partículas de sílica modificadas contendo o fármaco modelo (sem qualquer camada de biopolímero) e das partículas multicamada com 5 camadas de biopolímeros foi também estudada. Resumidamente, 250 μL de cada uma destas suspensões foram dispersos em 10 mL de tampão fosfato-citrato a pH 6 (6,42 mL de solução de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e 3,58 mL de solução de ácido cítrico 0,1 M). As amostras foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e mantidas em agitação contínua a 180 rpm. Em intervalos de tempo pré-determinados (1, 2, 6 e 24 horas), foram recolhidas alíquotas de 1 mL de cada dispersão e o mesmo volume de tampão foi adicionado para continuar o ensaio de libertação. Posteriormente, as amostras recolhidas foram centrifugadas a 10000 rpm durante 15 minutos e mediu-se a absorvância do sobrenadante por espectroscopia UV-vis (Shimadzu UV-1800) a 430 nm. A percentagem de libertação cumulativa foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Libertação cumulativa (\%)} = C_n + \frac{(1 \times C_{n-1})}{10} \times 100$$

Onde C_n corresponde à concentração num determinado tempo de libertação n .

2.7. Técnicas de caracterização

Os materiais de partida, nomeadamente o alginato e o quitosano, foram caracterizados no que diz respeito ao pH e potencial zeta das respetivas soluções, enquanto as partículas de sílica modificadas e as nanofibrilas de lisozima foram caracterizadas relativamente ao pH, potencial zeta, tamanho e morfologia.

A construção das partículas multicamada com os vários biopolímeros foi confirmada através da medição do potencial zeta após a deposição de cada camada. O tamanho das partículas foi determinado por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), enquanto que a morfologia foi caracterizada simultaneamente por SEM e STEM (SEM em modo de transmissão).

2.7.1. Potencial Zeta

O potencial zeta foi determinado utilizando o equipamento Zetasizer Nano – ZS da Malvern Instruments. Os valores apresentados correspondem à média de três medições realizadas a 25 °C. As amostras foram preparadas diluindo cerca de 30 μ L do respetivo material: (a) em 1 mL de solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) no caso da sílica modificada, do quitosano e das partículas cuja última camada corresponda ao quitosano ou às nanofibrilas de lisozima, ou (b) em 1 mL de água ultrapura no caso do alginato, das nanofibrilas de lisozima e das partículas cuja última camada corresponda ao alginato.

2.7.2. pH

A medição do pH das amostras foi efetuada utilizando um medidor Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP Meter.

2.7.3. Microscopia Eletrónica de Varrimento

As partículas de sílica modificadas, as nanofibrilas de lisozima e as partículas multicamada foram analisadas por SEM e STEM, com vista à avaliação da sua morfologia e determinação das respetivas dimensões. O microscópio utilizado foi um Hitachi SU-70, operando a uma voltagem de 15 kV.

As amostras foram preparadas diluindo cerca de 30 μL de cada amostra em 1 mL de água ultrapura e depositando uma gota dessa suspensão numa grelha de cobre. As amostras foram secas ao ar, à temperatura ambiente, antes da sua visualização. As dimensões dos materiais analisados por SEM foram determinadas recorrendo ao uso do programa Image J para uma amostragem mínima de 50 amostras (partículas de sílica modificadas, nanofibrilas de lisozima ou partículas multicamada).

3. Resultados e discussão

Neste capítulo da presente dissertação serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo deste trabalho, cujo objetivo é desenvolver partículas multicamada para libertação controlada de um fármaco modelo anticancerígeno.

3.1. Preparação e caracterização do *template* de sílica modificada

Na produção de sistemas multicamada, é possível utilizar uma grande variedade de substratos, servindo estes de *template* na construção dos mesmos (76). Os *templates* mais utilizados na literatura são tipicamente à base de poliestireno, sílica ou carbonato de cálcio, sendo também utilizados outros materiais, como a melanina formaldeído ou unidades biológicas (eritrócitos). É necessário ter em conta que os *templates* têm de ser estáveis durante todo o processo de montagem das camadas (77).

Neste trabalho, o *template* escolhido foram partículas de sílica modificadas com grupos amina, tal como ilustrado na figura 11 (72). Os grupos amina foram introduzidos na superfície das partículas de sílica ($\text{SiO}_2\text{-OH}$) através do agente de acoplamento APTES. Estas partículas de sílica modificadas ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2$) podem ser dispersas numa solução aquosa ligeiramente ácida, promovendo-se a protonação dos grupos aminas presentes na superfície das partículas. Deste modo, as partículas de sílica modificadas, dispersas numa solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), apresentam um valor de potencial zeta na ordem dos $+96 \pm 2$ mV. Este valor de carga positiva permitiu concluir que, aquando da deposição dos biopolímeros (alginato, quitosano e nanofibrilas de lisozima) para a montagem das camadas, se deveria iniciar a mesma pela deposição do alginato, ou seja, o biopolímero de carga negativa. Uma vez que o pH influencia a carga do polielectrólito, mediu-se o pH da suspensão das partículas de sílica modificadas, tendo-se obtido um valor próximo de 3.

Com vista à análise da morfologia das partículas de sílica modificadas, foram preparadas amostras para visualização em STEM (figuras 12 A e B) e SEM (figuras 12 C, D e E). Como se pode verificar nas micrografias, as partículas de sílica modificadas apresentam uma morfologia esférica com um tamanho médio de 480 ± 8 nm. Para além disso, estas partículas possuem uma superfície lisa (sem rugosidades, figura 12 E) e apresentam-se bem dispersas não sendo visível a formação de agregados (figura 12 A-D).

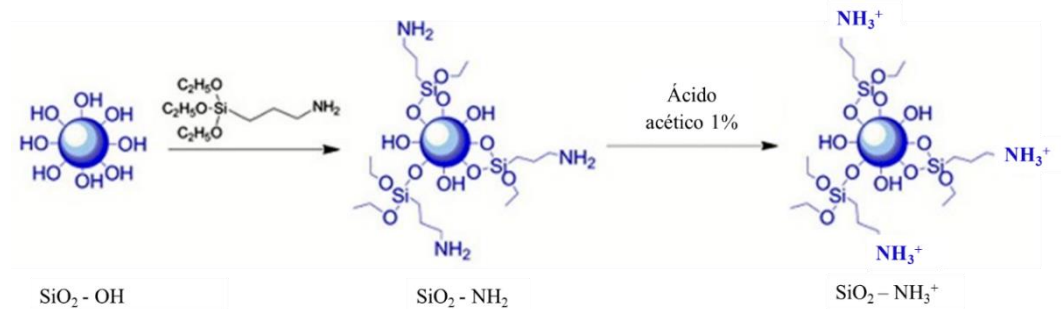


Figura 11 - Esquema reacional da preparação das partículas de sílica modificadas.

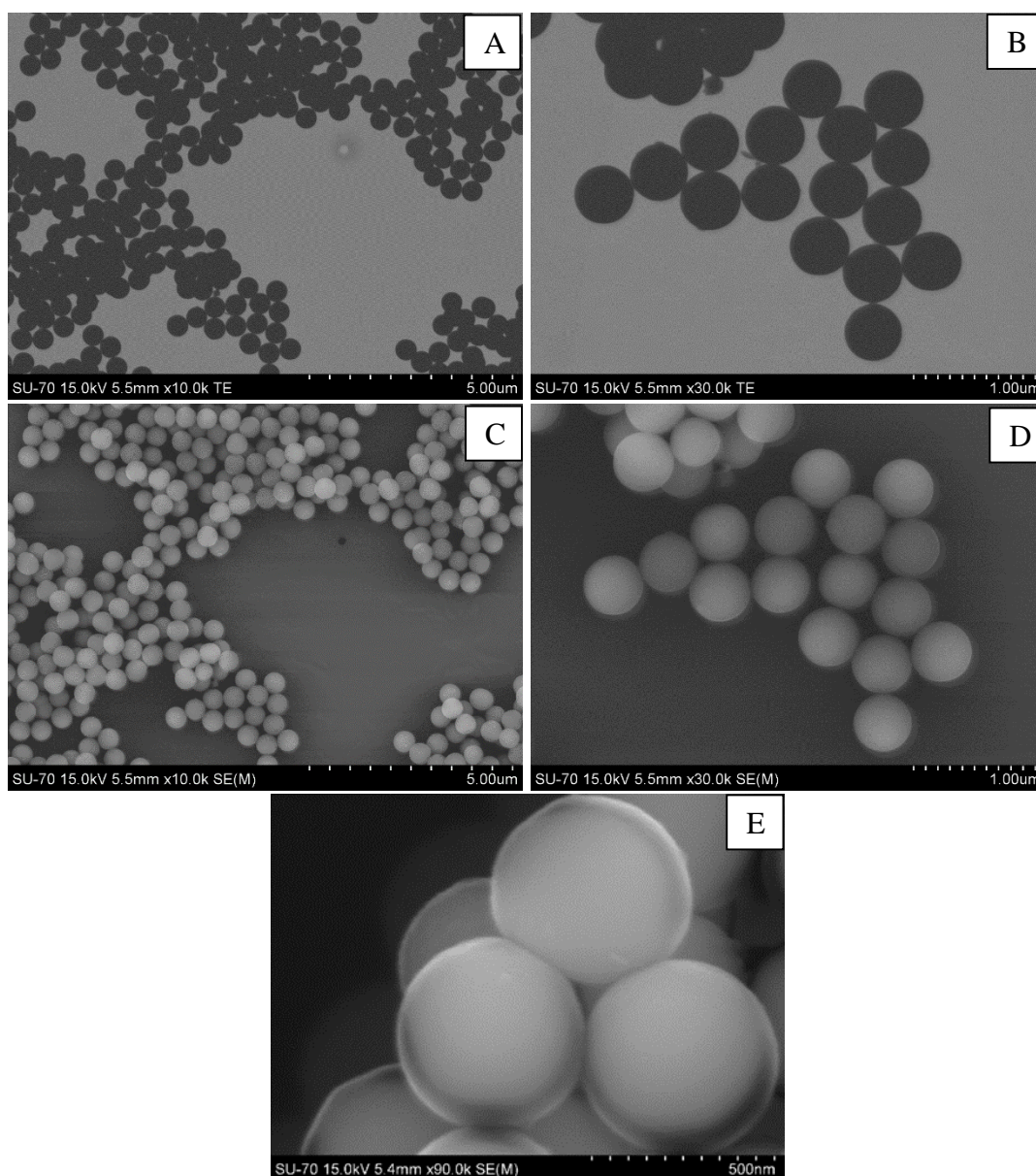


Figura 12 - Micrografias de STEM e SEM das partículas de sílica modificadas. As imagens A e B foram captadas em modo STEM e as imagens C, D e E foram captadas em modo SEM. As ampliações utilizadas foram 10000 \times (A e C), 30000 \times (B e D) e 90000 \times (E).

3.2. Preparação e caracterização das nanofibrilas de lisozima

Neste trabalho foram preparadas nanofibrilas de lisozima com diferentes razões de aspeto (quociente entre o comprimento e largura), através da utilização de agentes de fibrilação distintos, ou seja, [Ch]Cl ou DES ([Ch]Cl:Ac, proporção molar 1:1). O uso de nanofibrilas com tamanhos diferentes tem como objetivo futuro avaliar o efeito da razão de aspeto no desempenho mecânico das partículas multicamada, bem como na libertação controlada de fármacos. As nanofibrilas de lisozima apresentam carga positiva, certamente devido à presença dos aminoácidos lisina, arginina e histidina (78), encontrando-se na ordem dos $+15 \pm 0,4$ mV para as nanofibrilas preparadas com o DES e $+11 \pm 1$ mV para as nanofibrilas preparadas com o [Ch]Cl. Desta forma, as nanofibrilas de lisozima serão incorporadas após a deposição da camada de alginato (camada 5).

Relativamente ao pH, as suspensões aquosas das nanofibrilas de lisozima com diferentes razões de aspeto apresentam ambos valores na ordem de 6. Contudo, após a sua deposição nas partículas, atendendo a que o processo das lavagens é efetuado com uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), o valor do pH diminui para valores na ordem de 3.

Com vista à observação da morfologia das nanofibrilas de lisozima, foram recolhidas micrografias em modo STEM, que se encontram representadas na figura 13. De acordo com as micrografias, as nanofibrilas de lisozima preparadas com diferentes agentes de fibrilação apresentam uma morfologia fibrilar alongada com um comprimento médio de 611 ± 325 nm para as fibrilas preparadas com o DES e de 536 ± 243 nm para as fibrilas preparadas com o [Ch]Cl, e uma espessura média de 10 ± 3 nm e 16 ± 7 nm, respetivamente. Estes resultados indicam que as nanofibrilas de lisozima preparadas com o DES ([Ch]Cl:Ac) apresentam uma razão de aspeto de 61,1, valor este que é cerca do dobro do obtido para as nanofibrilas preparadas com o [Ch]Cl (razão de aspeto = 33,5).

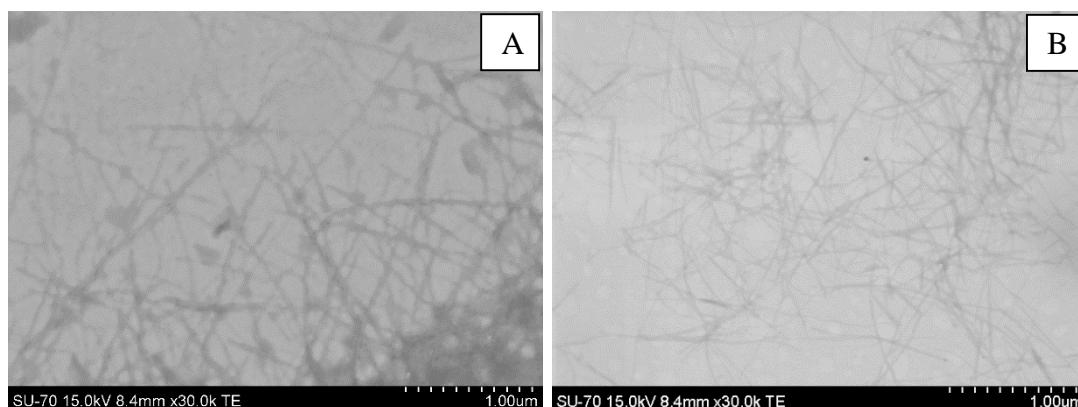


Figura 13 - Micrografias de STEM recolhidas para as nanofibrilas de lisozima preparadas com DES (A) e com [Ch]Cl (B). A ampliação utilizada foi 30000 \times (A e B).

3.3. Preparação e caracterização das partículas multicamada

De seguida, as partículas multicamada foram preparadas pelo método camada-a-camada (figura 14) e a sua construção com os vários biopolímeros (alginato, quitosano e nanofibrilas de lisozima) foi confirmada através da medição do potencial zeta de cada camada. Posteriormente as partículas multicamada foram também caracterizadas por SEM e STEM.

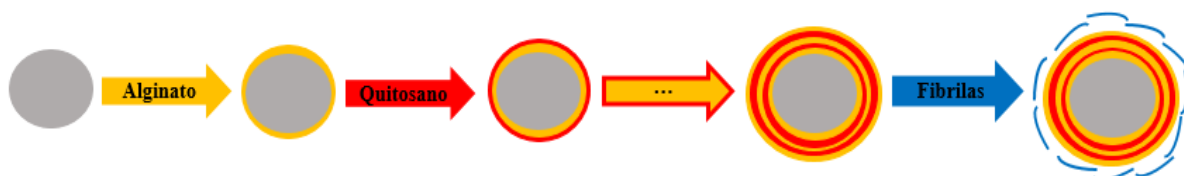


Figura 14 - Preparação de partículas multicamada através do método camada-a-camada. Sobre as partículas de sílica modificadas (cinzento) é depositada a primeira camada, correspondente ao alginato (amarelo), seguida pela deposição do quitosano (vermelho). A deposição alternada destes dois biopolímeros continua até serem depositadas cinco camadas, terminando o processo com a deposição da sexta camada correspondente às nanofibrilas de lisozima (azul).

3.3.1. Potencial zeta e pH

Antes de se iniciar a preparação dos sistemas multicamada, o potencial zeta dos polielectrólitos foi medido, tendo-se obtido valores da ordem de $+50 \pm 4$ mV para o quitosano, devido à presença de grupos amina protonados, e de -60 ± 1 mV para o alginato, devido à presença de grupos carboxilato. Ambos os valores estão de acordo com os

reportados na literatura, uma vez que, por exemplo, os autores Rivera *et al.* (35) obtiveram valores de potencial zeta de $+48,20 \pm 7$ mV para o quitosano e de $-58,28 \pm 4,48$ mV para o alginato, a um pH de 3 e de 6, respetivamente.

Com vista à preparação das partículas multicamada, iniciou-se a deposição das camadas começando pelo alginato. Após término da deposição deste biopolímero, o potencial zeta foi medido novamente, verificando-se que ocorreu a reversão dos potenciais (figura 15) de positivo (sílica modificada) para negativo (alginato), o que infere que o polielectrólito revestiu as partículas de sílica modificadas, sendo então obtida a primeira camada. De seguida, avançou-se para a deposição da segunda camada, com quitosano, tendo-se confirmado que também este polielectrólito foi depositado. Assim, prosseguiu-se o trabalho até alcançar o número de camadas desejado, nomeadamente cinco (SiO₂ modificada (*template*) / alginato / quitosano / alginato / quitosano / alginato), tendo-se verificado a recorrente reversão do potencial zeta entre as camadas de carga oposta, como se pode ver pelo gráfico da figura 15. A alternância dos valores de potencial zeta é um indicador do sucesso da montagem dos polielectrólitos de quitosano e alginato sob as partículas de sílica modificadas, tal como verificado por exemplo pelos autores Rivera *et al.* (35).

Após a verificação da reversão dos potenciais e consequente deposição das camadas, a amostra foi dividida em duas partes, sendo que numa delas foram depositadas as nanofibrilas de lisozima preparadas com DES e na outra parte as nanofibrilas preparadas com [Ch]Cl. De acordo com a figura 15, a reversão do potencial de negativo (alginato) para positivo (nanofibrilas de lisozima) indica que ambos os tipos de nanofibrilas foram depositados nas respetivas partículas.

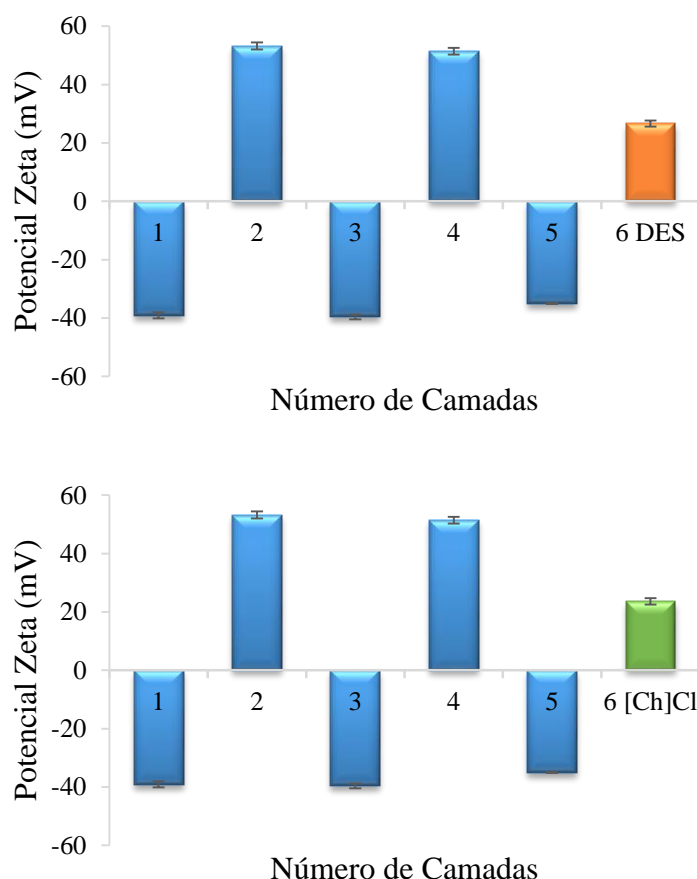


Figura 15 – Gráficos de potencial zeta versus número de camadas para as partículas utilizando sílica modificada como *template*. As camadas com número ímpar correspondem ao alginato e as com número par correspondem ao quitosano. A sexta camada corresponde às nanofibrilas de lisozima com diferentes razões de aspecto preparadas com diferentes agentes de fibrilação: DES (gráfico em cima) e [Ch]Cl (gráfico em baixo).

Para acompanhar as mudanças de pH ao longo da deposição das diversas camadas de polieletrólitos, o mesmo foi medido após cada deposição e lavagem das partículas. O pH das soluções dos polieletrólitos foi de cerca de 3 para o quitosano e de cerca de 6 para o alginato, tendo como referência o trabalho de Rivera *et al.* (35) e Ye *et al.* (36), respetivamente, uma vez serem os valores que permitem uma densidade de carga suficiente na superfície das partículas de forma a facilitar a interação dos referidos biopolímeros. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados no gráfico da figura 16, e como se pode verificar, os valores oscilaram de forma constante para cada polieletrólito, sendo que se mantêm na gama pretendida para cada um deles. De notar que a camada das nanofibrilas de lisozima apresenta um pH na ordem de 3, uma vez que esta última camada é lavada utilizando uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), o que provoca uma diminuição no valor do pH.

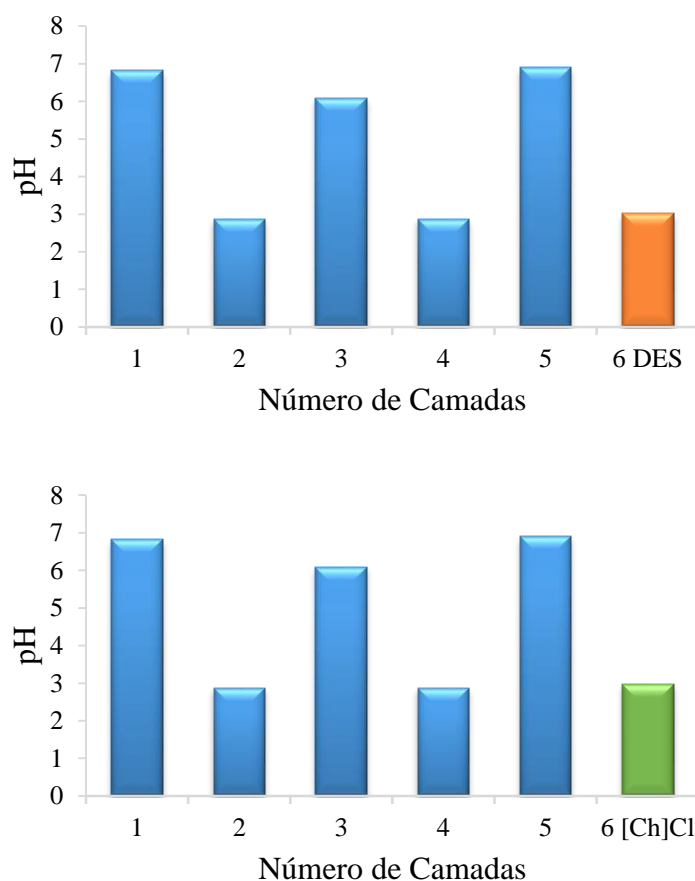


Figura 16 – Gráficos da variação de pH ao longo das seis deposições de polieletrólitos. As camadas com número ímpar correspondem ao alginato e as com número par correspondem ao quitosano. A sexta camada corresponde às nanofibrilas de lisozima com diferentes razões de aspeto preparadas com diferentes agentes de fibrilação: DES (gráfico em cima) e [Ch]Cl (gráfico em baixo).

3.3.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento

Com vista a verificar a deposição das camadas, bem como a morfologia das partículas multicamada e o respetivo tamanho, foram recolhidas imagens de STEM, na terceira (figura 17), quarta (figuras 18 e 19) e quinta (figura 20) camadas, correspondentes ao alginato, quitosano e alginato, respetivamente. Pela análise das micrografias, verifica-se que as partículas apresentam uma morfologia esférica (tal como o *template*), e que o seu tamanho médio, determinado usando o programa Image J, na terceira camada é de 485 ± 14 nm e na quarta camada é de 497 ± 9 nm. Este ligeiro aumento de valores em relação ao *template* de partículas de sílica modificadas (480 ± 8 nm) e também entre a terceira e a quarta camadas

indica que ocorreu a deposição dos biopolímeros, embora cada camada depositada apresente uma espessura muito reduzida. Pela análise pormenorizada da quarta camada, usando uma maior ampliação, nomeadamente de 90000 vezes (figura 19), foi possível observar a morfologia da superfície das partículas. Esta apresenta-se rugosa, o que corrobora mais uma vez a ocorrência de deposição dos biopolímeros nas partículas de sílica modificadas.

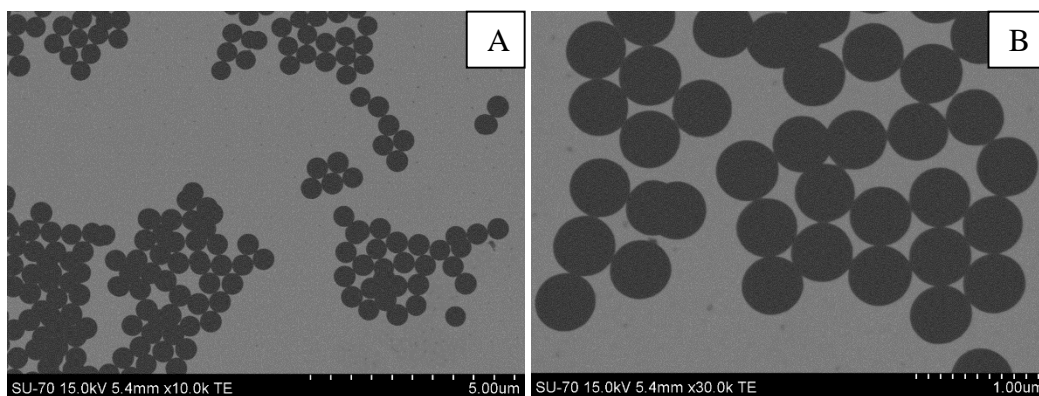


Figura 17 - Micrografias de STEM recolhidas para as partículas revestidas com 3 camadas, sendo a última correspondente ao alginato. As ampliações utilizadas foram as seguintes: 10000 \times (A) e 30000 \times (B).

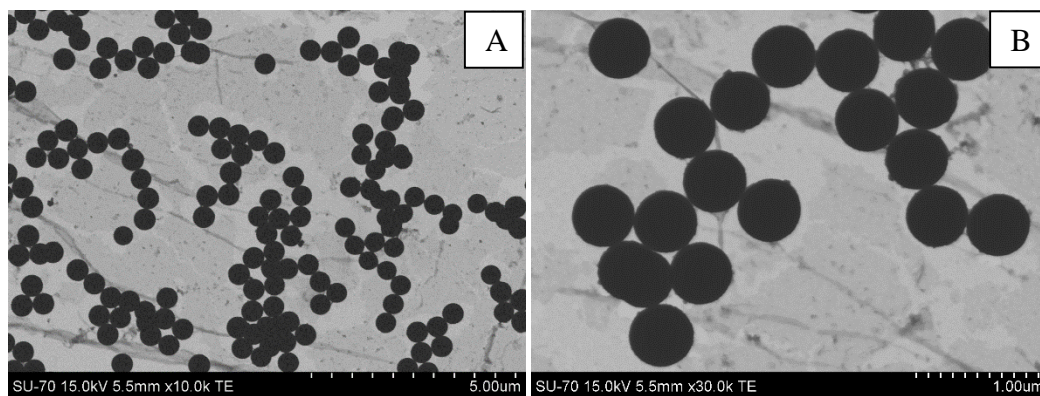


Figura 18 - Micrografias de STEM recolhidas para as partículas revestidas com 4 camadas, sendo a última correspondente ao quitosano. As ampliações utilizadas foram as seguintes: 10000 \times (A) e 30000 \times (B).

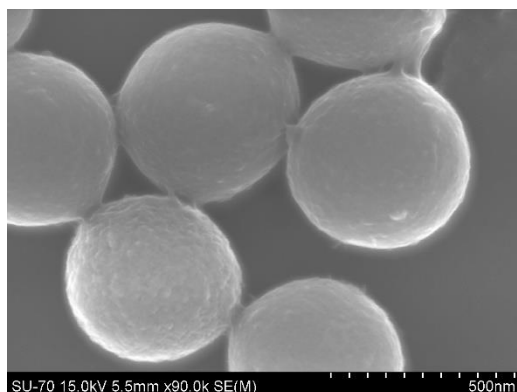


Figura 19 – Ampliação da quarta camada, revelando a morfologia da superfície das partículas multicamada. A micrografia foi recolhida em SEM utilizando uma ampliação de 90000 \times .

As micrografias de SEM (figura 20 A) e STEM (figura 20 B) da quinta camada das partículas multicamada (correspondente ao alginato) confirmam inequivocamente a individualidade de cada partícula (figura 20 B), bem como a ausência de formação de agregados entre elas (figura 20 A). Pela análise das micrografias, utilizando o programa Image J, verifica-se que as partículas mantêm a morfologia esférica e que o seu tamanho médio é de 499 ± 10 nm, o que indica mais uma vez que cada camada apresenta uma espessura muito reduzida.

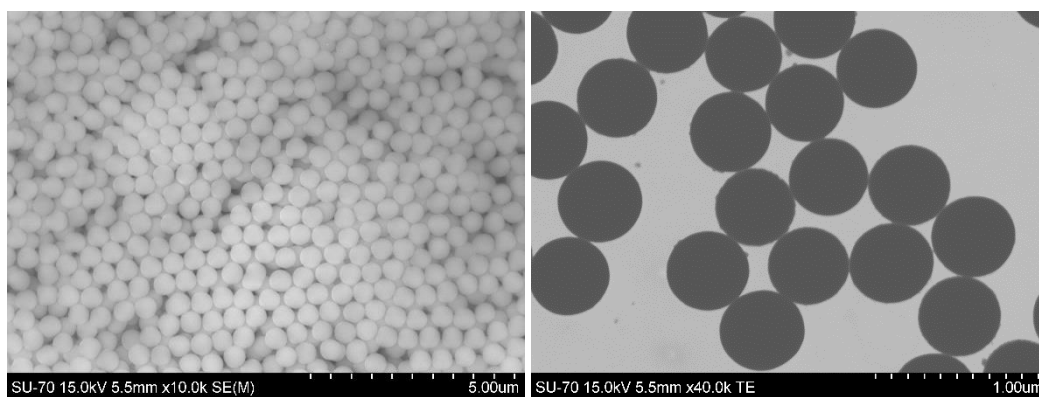


Figura 20 - Micrografias de SEM (A) e STEM (B) da quinta camada (alginato) das partículas multicamada utilizando uma ampliação de 10000 \times (A) e 40000 \times (B).

As partículas contendo as nanofibrilas de lisozima foram também alvo de avaliação por SEM e STEM, sendo que na figura 21 se encontram representadas as micrografias das partículas contendo as nanofibrilas de lisozima preparadas com DES na última camada e na figura 22 as micrografias das partículas cuja última camada corresponde às nanofibrilas de

lisoizima preparadas com [Ch]Cl. Como se pode verificar pelas imagens, as nanofibrilas encontram-se de facto depositadas nas partículas multicamada. Nas imagens obtidas em modo SEM é possível verificar ainda algumas rugosidades e formações fibrilares à volta das partículas, que correspondem às referidas nanofibrilas. As nanofibrilas preparadas com DES, isto é, com maior razão de aspeto, aparentam ter uma deposição mais uniforme nas partículas multicamada.

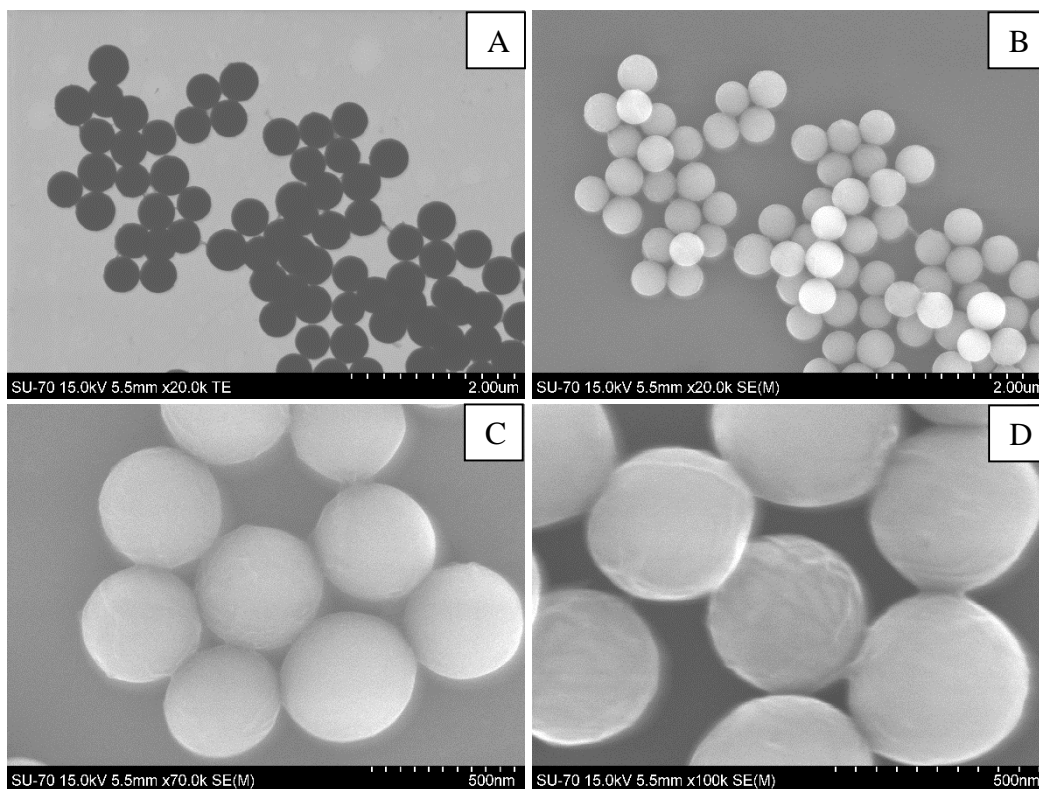


Figura 21 - Micrografias de STEM (A) e SEM (B, C e D) recolhidas para as partículas revestidas com 6 camadas, sendo a última correspondente às nanofibrilas de lisoizima com maior razão de aspeto (preparadas com DES). As ampliações utilizadas foram as seguintes: 20000× (A e B), 70000× (C) e 100000× (D).

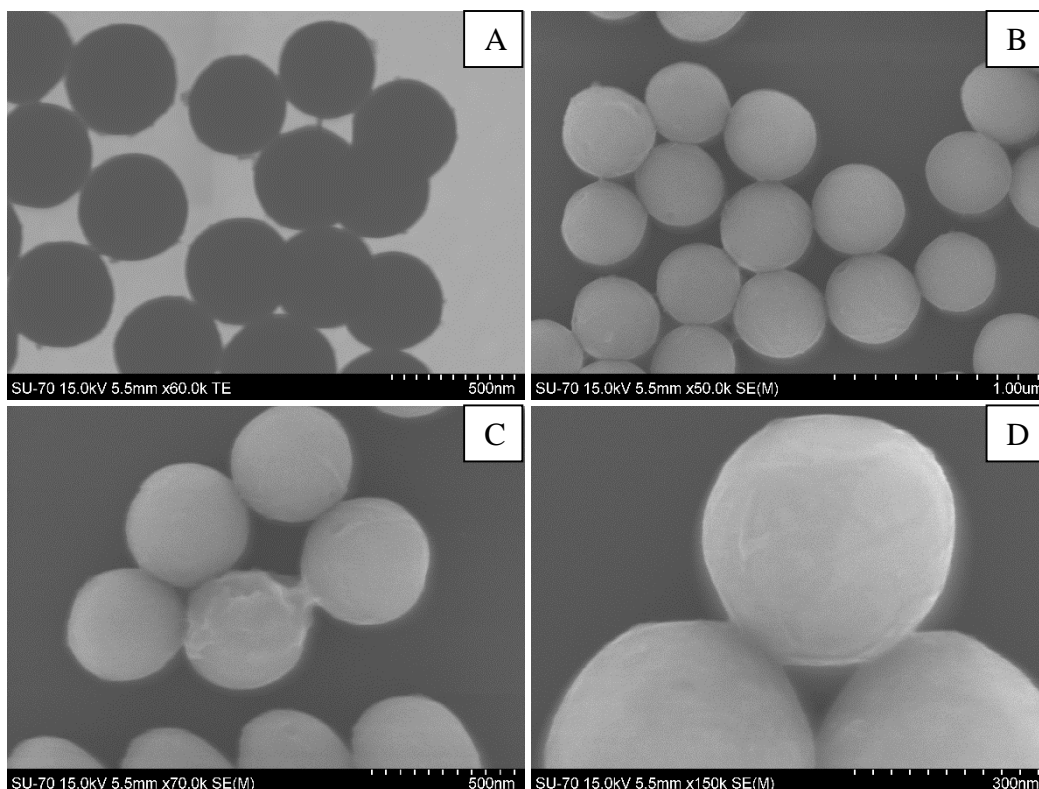


Figura 22 - Micrografias de STEM (A) e SEM (B, C e D) recolhidas para as partículas revestidas com 6 camadas, sendo a última correspondente às nanofibrilas de lisozima com menor razão de aspeto (preparadas com [Ch]Cl). As ampliações utilizadas foram as seguintes: 60000 \times (A), 50000 \times (B), 70000 \times (C) e 150000 \times (D).

3.4. Incorporação da curcumina (fármaco modelo) nas partículas multicamada

Uma vez confirmada a viabilidade da construção das partículas multicamada utilizando partículas de sílica modificadas como *template* e seis camadas de biopolímeros, passou-se para o passo de incorporação de um fármaco modelo, nomeadamente a curcumina. Este fármaco anticancerígeno foi incorporado nas partículas de sílica modificadas antes da construção das camadas dos biopolímeros. O sucesso da incorporação da curcumina nas partículas de sílica modificadas foi confirmado pela mudança de cor do *template* de branco para amarelo, tal como ilustrado na figura 23.

A quantificação da curcumina incorporada nas partículas de sílica modificadas foi efetuada por espectroscopia de UV-vis através da medição da absorvância a 430 nm dos sobrenadantes contendo a curcumina que não foi incorporada. Assim, através da reta de calibração determinada previamente, obteve-se uma percentagem de incorporação de aproximadamente 61%, o que corresponde a cerca de 61 μg de curcumina por mg de

partículas de sílica modificadas. Esta percentagem de incorporação é superior ao valor obtido pelos autores Taebnia *et al.* (75), ou seja 34%, para partículas de sílica modificadas com um tamanho quatro vezes inferior (< 100 nm) ao das partículas preparadas no presente trabalho (480 ± 8 nm). De notar que, face à limitação temporal, não foi possível efetuar réplicas para a incorporação da curcumina nas partículas de sílica modificadas.

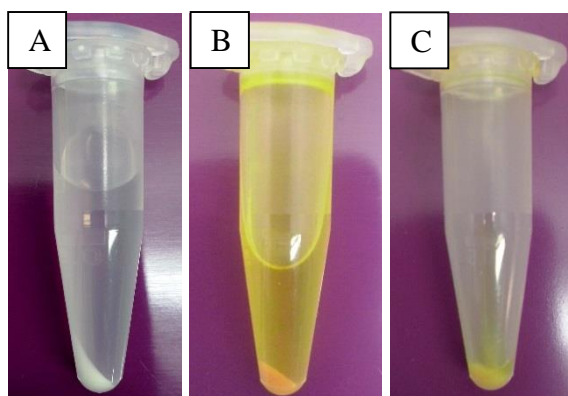


Figura 23 – Foto das partículas de sílica modificadas antes (A) e após (B, com sobrenadante e C, sem sobrenadante) a incorporação da curcumina, ilustrando a sua mudança de cor.

Depois da incorporação da curcumina, o potencial zeta da suspensão do *template* com curcumina foi novamente medido e continuou-se a obter um valor positivo na ordem dos $+92 \pm 2$ mV. Assim sendo, prosseguiu-se com a construção das seis camadas de biopolímeros: alginato / quitosano / alginato / quitosano / alginato / nanofibrilas de lisozima, que foi confirmada novamente pela constante reversão do potencial zeta de negativo para positivo e vice-versa (dependendo do biopolímero a ser depositado), de acordo com os dados facultados na figura 24. O pH foi igualmente medido, tendo-se confirmado uma variação semelhante à verificada para as partículas multicamada sem curcumina (figura 25). De salientar que nesta fase do trabalho, o fármaco modelo só foi incorporado nas partículas multicamada contendo nanofibrilas de lisozima preparadas com DES como agente de fibrilação (razão de aspeto = 61,1).

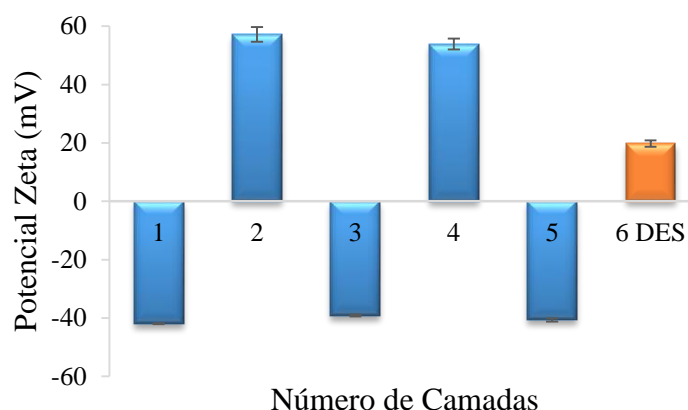


Figura 24 - Gráfico de potencial zeta versus número de camadas para as partículas cujo *template* contém curcumina. As camadas com número ímpar correspondem ao alginato e as com número par correspondem ao quitosano. A sexta camada corresponde às nanofibrilas de lisozima preparadas com o agente de fibrilação DES.

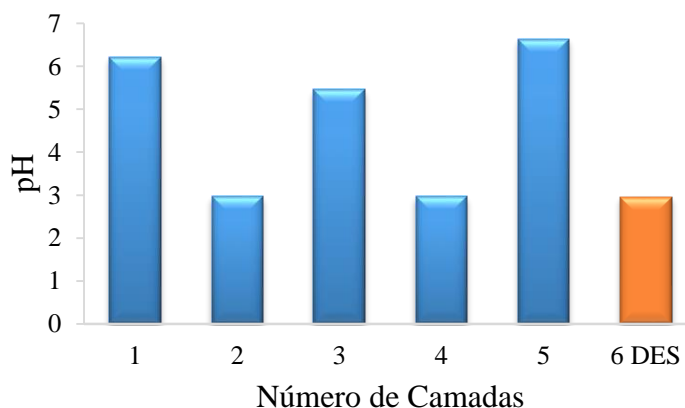


Figura 25 - Gráfico da variação de pH ao longo das seis deposições de polieletrólitos. As camadas com número ímpar correspondem ao alginato e as com número par correspondem ao quitosano. A sexta camada corresponde às nanofibrilas de lisozima preparadas com o agente de fibrilação DES.

A morfologia do *template* com curcumina e das partículas multicamada foi igualmente verificada por SEM. De acordo com a figura 26 A e B, tanto o *template* com curcumina como as partículas multicamada apresentam uma morfologia esférica e o tamanho médio encontra-se na mesma gama de tamanhos obtidos para os mesmos materiais sem a curcumina incorporada. Além disso, as micrografias das partículas com 6 camadas (figura 26 C e D) confirmam a deposição das nanofibrilas de lisozima.

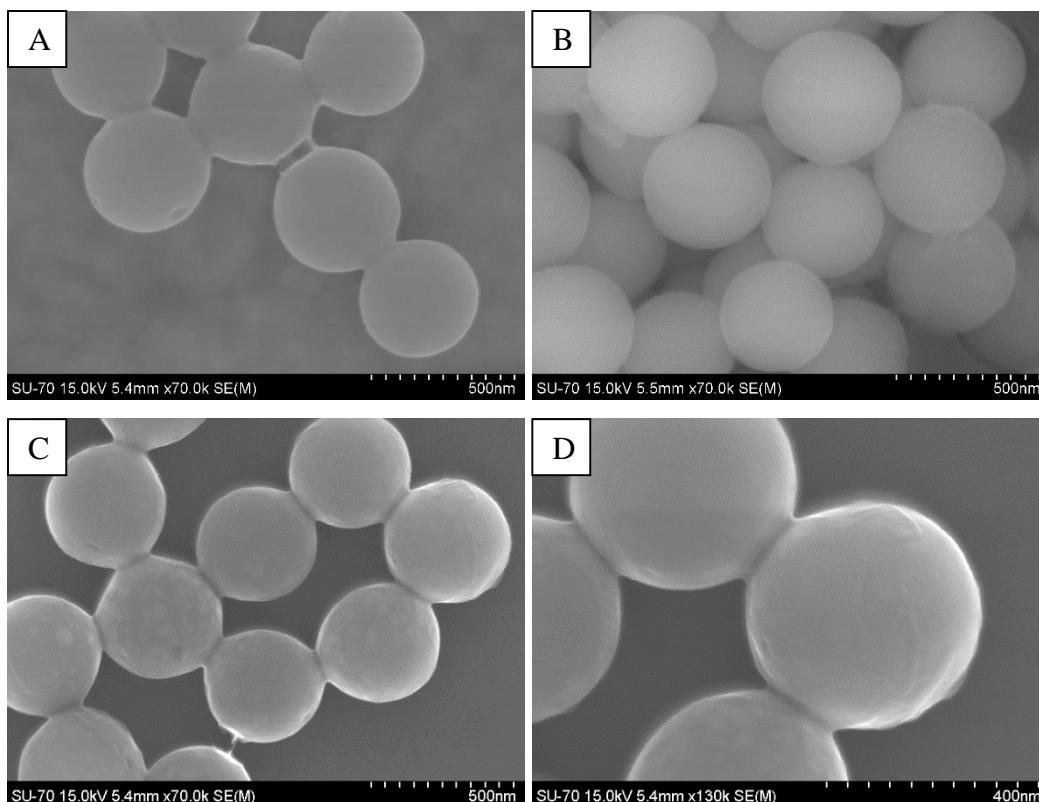


Figura 26 - Micrografias de SEM das partículas de sílica modificadas após incorporação da curcumina (A), e das camadas 5 (B) e 6 (C e D) das partículas multicamada. As ampliações utilizadas foram as seguintes: 70000× (A, B e C) e 130000× (D).

3.5. Perfil de liberação da curcumina a partir das partículas multicamada: ensaios preliminares

Ensaio preliminares de liberação da curcumina a partir das partículas multicamada com 6 camadas (alginato / quitosano / alginato / quitosano / alginato / nanofibrilas de lisozima preparadas com DES) foram efetuados durante um período de 24 horas em incubação a 37 °C. Para efeitos comparativos o perfil de liberação da curcumina foi também avaliado para as partículas de sílica modificadas (sem qualquer camada de biopolímero) e para as partículas multicamada com 5 camadas de biopolímeros. A figura 27 apresenta as percentagens de liberação cumulativa obtidas para cada uma das amostras referidas anteriormente.

Analisando o gráfico da figura 27 é possível verificar um padrão de liberação comum para as três amostras, isto é, no início a liberação ocorre de uma forma rápida, tornando-se depois mais lenta até atingir um patamar.

No caso particular das partículas de sílica modificadas, obteve-se então uma liberação inicial rápida, na qual cerca de 35% de curcumina é libertada, seguindo-se depois a fase patamar, após cerca de 3 horas, na qual a quantidade de curcumina libertada permanece constante. Retomando o exemplo do trabalho dos autores Taebnia *et al.* (75), os seus resultados para a liberação da curcumina a partir das partículas de sílica modificadas mostraram também uma liberação inicial rápida, durante a qual uma quantidade substancial de curcumina é libertada (cerca de 58%), seguida por uma taxa de liberação mais lenta atingindo-se um patamar após 12 horas. Portanto, o perfil de liberação da curcumina obtido neste trabalho a partir das partículas de sílica modificadas está de acordo com o referido na literatura.

As partículas com 5 camadas de biopolímeros evidenciaram também um perfil de liberação rápido no início, com uma percentagem cumulativa de cerca de 20% de curcumina libertada na primeira hora e início da fase patamar às 6 horas de liberação. Comparativamente às partículas de sílica modificadas, esta liberação é mais controlada. Os autores Kim *et al.* (74) incorporaram curcumina em partículas de sílica e revestiram as mesmas com um complexo de ácido tânico-ferro (III), sendo a liberação da curcumina avaliada antes e após a deposição deste complexo, a diversos pH. A um pH de 6, na primeira hora, a liberação da curcumina a partir das partículas de sílica ocorreu de forma muito rápida (cerca de 60%), enquanto que na liberação a partir das partículas de sílica revestidas a liberação ocorreu de forma mais lenta (cerca de 40%). Mesmo sendo os ensaios realizados no presente trabalho apenas preliminares, e não sendo os materiais totalmente comparáveis aos descritos no estudo de Kim *et al.* (74) pode-se concluir que a deposição camada-a-camada de biopolímeros para revestimento das partículas de sílica é também uma boa estratégia para controlar a velocidade de liberação da curcumina.

Comparando as três amostras estudadas, o perfil de liberação da curcumina ocorre de forma mais rápida a partir das partículas de sílica modificadas do que a partir das partículas multicamada (5 ou 6 camadas). Para além disso, a liberação deste fármaco modelo é mais controlada, nas partículas com 6 camadas, em que a última corresponde às nanofibrilas de lisozima preparadas com DES. Para além da velocidade de liberação, ainda

se observa a existência de uma relação entre a quantidade de curcumina libertada e a quantidade de camadas depositadas. Isto é, para as partículas de sílica modificadas são libertadas maiores quantidades de fármaco (cerca de 35% na primeira hora) do que para as partículas multicamada com 5 (cerca de 20%) e 6 (cerca de 10%) camadas.

De notar que, face à limitação temporal, não foi possível efetuar réplicas para cada uma das amostras representadas. Apesar de estes serem ensaios preliminares, de o tempo de libertação ter sido curto e de se terem utilizado quantidades de material muito reduzidas, pode-se constatar que o aumento do número de camadas depositadas nas partículas promove uma libertação mais prolongada e, além disso, a deposição das nanofibrilas de lisozima parece auxiliar no controlo da libertação da curcumina, aparentando ser então vantajosa a sua aplicação em sistemas multicamada para a libertação controlada de fármacos.

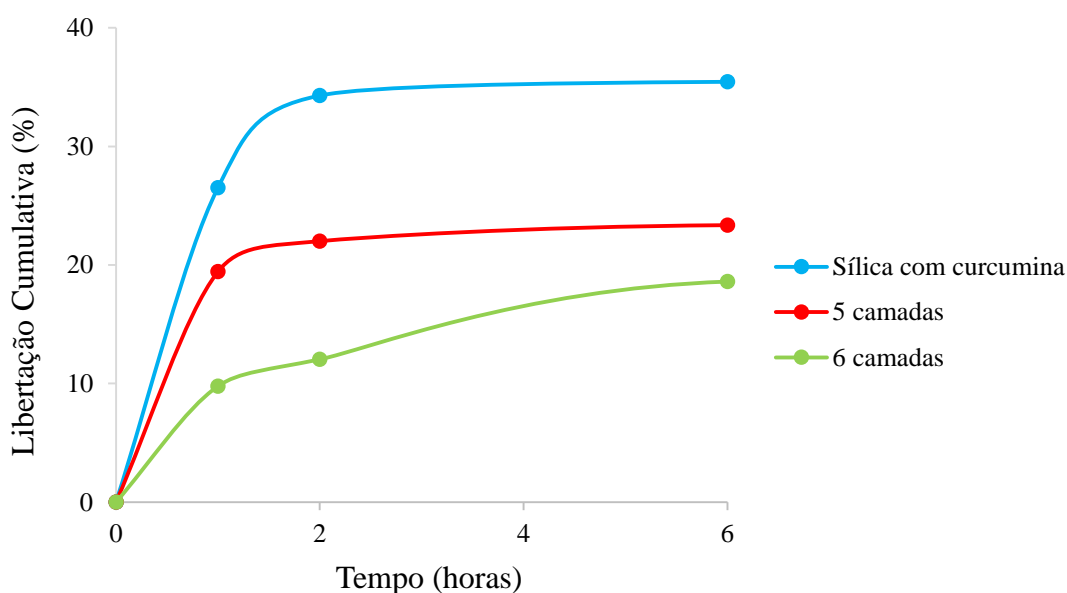


Figura 27 – Perfil de libertação cumulativa da curcumina no meio com tampão fosfato-citrato (pH 6) para as partículas de sílica modificadas e para as partículas multicamada com 5 e 6 camadas de biopolímeros (as linhas são apenas para orientação visual).

4. Conclusões e trabalho futuro

No presente trabalho foram desenvolvidas partículas multicamada utilizando biopolímeros na sua construção, nomeadamente alginato, quitosano e nanofibrilas de lisozima.

A primeira parte do trabalho consistiu na preparação do *template* de partículas de sílica modificadas com grupos amina e das nanofibrilas de proteína. As partículas de sílica modificadas possuem um valor positivo de potencial zeta, $+96 \pm 2$ mV, e uma morfologia esférica com tamanho de partícula de cerca de 480 ± 8 nm. Por sua vez, as nanofibrilas de lisozima também possuem um potencial zeta positivo de $+15 \pm 0,4$ mV para as fibrilas preparadas com DES ([Ch]Cl:Ac) e $+11 \pm 1$ mV para as fibrilas preparadas com [Ch]Cl, e uma morfologia fibrilar alongada com razões de aspeto de 61,1 (comprimento = 611 ± 325 nm; largura = 10 ± 3 nm) e 33,5 (comprimento = 536 ± 243 nm; largura = 16 ± 7 nm), respetivamente.

Na fase seguinte do trabalho, procedeu-se à montagem camada-a-camada das partículas multicamada, na qual diferentes biopolímeros (alginato e quitosano) foram depositados sobre o *template* de sílica modificada. A constante reversão do potencial zeta de negativo (alginato) para positivo (quitosano) e vice-versa, permitiu confirmar a deposição dos respetivos biopolímeros nas partículas. O tamanho obtido por SEM foi de 499 ± 10 nm, o que indica igualmente a deposição dos biopolímeros nas partículas, uma vez que estas aumentam de tamanho relativamente às partículas de sílica modificadas.

O passo subsequente consistiu na deposição de nanofibrilas de lisozima com diferentes razões de aspeto, tendo-se verificado a reversão do potencial zeta e, portanto, a sua deposição, que foi posteriormente confirmada por SEM. As nanofibrilas preparadas com DES aparentam ter uma deposição mais uniforme nas partículas multicamada do que as preparadas com [Ch]Cl.

Após a verificação da viabilidade de construção das partículas multicamada utilizando biopolímeros na sua construção, um fármaco modelo, nomeadamente a curcumina, foi incorporado com sucesso nas partículas de sílica modificadas com uma percentagem de incorporação de 61%, ou seja, cerca de $61 \mu\text{g}$ de curcumina por mg de partículas de sílica modificadas. A libertação *in vitro* da curcumina foi testado e os resultados preliminares evidenciam um perfil de libertação controlado do fármaco modelo a partir das

partículas contendo 6 camadas de biopolímeros relativamente às partículas de sílica modificadas bem como às partículas contendo 5 camadas de biopolímeros.

Uma vez que estas partículas multicamada apresentam características promissoras para uma possível aplicação na libertação controlada de fármacos anticancerígenos, o trabalho futuro passará inevitavelmente pelo estudo detalhado do desempenho mecânico das partículas multicamada tendo em conta que se usaram nanofibrilas de lisozima com diferentes razões de aspeto, pela avaliação minuciosa do perfil de libertação *in vitro* do fármaco modelo das partículas multicamada a diferentes valores de pH, bem como pela avaliação da respetiva citotoxicidade e internalização celular em células saudáveis e tumorais.

Referências Bibliográficas

1. Ahmad MZ, Alkahtani SA, Akhter S, Ahmad FJ, Ahmad J, Akhtar MS, et al. Progress in nanotechnology-based drug carrier in designing of curcumin nanomedicines for cancer therapy: current state-of-the-art. *Journal of Drug Targeting*. 2016 Apr 20;24(4):273–93.
2. Santos GJL, Pinheiro DCSN. Ethnopharmacological aspects of therapy associated with antitumor activity. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 2016;10.
3. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004 Sep;56(11):1649–59.
4. Mohanta V, Madras G, Patil S. Layer-by-Layer Assembled Thin Film of Albumin Nanoparticles for Delivery of Doxorubicin. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2012 Mar 8;116(9):5333–41.
5. Costa RR, Alatorre-Meda M, Mano JF. Drug nano-reservoirs synthesized using layer-by-layer technologies. *Biotechnology Advances*. 2015 Nov;33(6):1310–26.
6. Borges J, Mano JF. Molecular Interactions Driving the Layer-by-Layer Assembly of Multilayers. *Chemical Reviews*. 2014 Sep 24;114(18):8883–942.
7. Acharya S, Hill JP, Ariga K. Soft Langmuir-Blodgett Technique for Hard Nanomaterials. *Advanced Materials*. 2009 Aug 7;21(29):2959–81.
8. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro, AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2006 Mar;2(1):8–21.
9. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010 Jan;385(1–2):113–42.
10. Johnston APR, Cortez C, Angelatos AS, Caruso F. Layer-by-layer engineered capsules and their applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2006 Oct;11(4):203–9.
11. Städler B, Price AD, Zelikin AN. A Critical Look at Multilayered Polymer Capsules in Biomedicine: Drug Carriers, Artificial Organelles, and Cell Mimics. *Advanced Functional Materials*. 2011 Jan 7;21(1):14–28.
12. Santander-Ortega MJ, Peula-García JM, Goycoolea FM, Ortega-Vinuesa JL. Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011 Feb;82(2):571–80.
13. Kurouski D, Washington J, Ozbil M, Prabhakar R, Shekhtman A, Lednev IK. Disulfide Bridges Remain Intact while Native Insulin Converts into Amyloid Fibrils. Colombo G, editor. *PLoS ONE*. 2012 Jun 1;7(6):e36989.
14. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: An ‘old-age’ disease with an ‘age-old’ solution. *Cancer Letters*. 2008 Aug;267(1):133–64.
15. Žganec M, Žerovnik E. Amyloid fibrils compared to peptide nanotubes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014 Sep;1840(9):2944–52.
16. Salahuddin P, Fatima MT, Abdelhameed AS, Nusrat S, Khan RH. Structure of amyloid oligomers and their mechanisms of toxicities: Targeting amyloid oligomers using novel therapeutic approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016 May;114:41–58.

17. Humblet-Hua N-PK, van der Linden E, Sagis LMC. Microcapsules with Protein Fibril Reinforced Shells: Effect of Fibril Properties on Mechanical Strength of the Shell. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012 Sep 19;60(37):9502–11.
18. Majorosova J, Petrenko VI, Siposova K, Timko M, Tomasovicova N, Garamus VM, et al. On the adsorption of magnetite nanoparticles on lysozyme amyloid fibrils. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016 Oct;146:794–800.
19. Johnson JJ, Mukhtar H. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Letters*. 2007 Oct;255(2):170–81.
20. Ariga K, McShane M, Lvov YM, Ji Q, Hill JP. Layer-by-layer assembly for drug delivery and related applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2011 May;8(5):633–44.
21. Chollet L, Saboural P, Chauvierre C, Villemin J-N, Letourneur D, Chaubet F. Fucoidans in Nanomedicine. *Marine Drugs*. 2016 Jul 29;14(8):145.
22. Liu XQ, Picart C. Layer-by-Layer Assemblies for Cancer Treatment and Diagnosis. *Advanced Materials*. 2016 Feb;28(6):1295–301.
23. Hammond PT. Building biomedical materials layer-by-layer. *Materials Today*. 2012 May;15(5):196–206.
24. Saha S, Loo SCJ. Recent developments in multilayered polymeric particles – from fabrication techniques to therapeutic formulations. *J Mater Chem B*. 2015;3(17):3406–19.
25. Vilela C, Figueiredo ARP, Silvestre AJD, Freire CSR. Multilayered materials based on biopolymers as drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016 Aug 5;1–12.
26. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2006 Jun;2(2):53–65.
27. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003 Feb;55(3):329–47.
28. Parveen R, Shamsi TN, Fatima S. Nanoparticles-protein interaction: Role in protein aggregation and clinical implications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017 Jan;94:386–95.
29. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Sep 13;54(5):631–51.
30. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*. 2011 Jul;36(7):887–913.
31. Prow TW, Kotov NA, Lvov YM, Rijnbrand R, Leary JF. Nanoparticles, molecular biosensors, and multispectral confocal microscopy. *The Histochemical Journal*. 2004 Aug;35(6):555–64.
32. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010 Jan;75(1):1–18.
33. De Jong WH, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(2):133–49.
34. Siddiqui IA, Sanna V. Impact of nanotechnology on the delivery of natural products for cancer prevention and therapy. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2016 Jun;60(6):1330–41.

35. Rivera MC, Pinheiro AC, Bourbon AI, Cerqueira MA, Vicente AA. Hollow chitosan/alginate nanocapsules for bioactive compound delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2015 Aug;79:95–102.
36. Ye S, Wang C, Liu X, Tong Z. Multilayer nanocapsules of polysaccharide chitosan and alginate through layer-by-layer assembly directly on PS nanoparticles for release. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2005 Jan;16(7):909–23.
37. Lertsutthiwong P, Rojsitthisak P, Nimmannit U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*. 2009 Apr;29(3):856–60.
38. Radhakrishnan K, Thomas MB, Pulakkat S, Gnanadhas DP, Chakravortty D, Raichur AM. Stimuli-responsive protamine-based biodegradable nanocapsules for enhanced bioavailability and intracellular delivery of anticancer agents. *Journal of Nanoparticle Research*. 2015 Aug;17(8).
39. Pastorino L, Erokhina S, Ruggiero C, Erokhin V, Petrini P. Fabrication and Characterization of Chitosan and Pectin Nanostructured Multilayers. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2015 May;216(10):1067–75.
40. Pinheiro AC, Bourbon AI, Cerqueira MA, Maricato É, Nunes C, Coimbra MA, et al. Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*. 2015 Jan;115:1–9.
41. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2012 Jan;37(1):106–26.
42. Goh CH, Heng PWS, Chan LW. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*. 2012 Mar;88(1):1–12.
43. Yang J-S, Xie Y-J, He W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2011 Feb;84(1):33–9.
44. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012 Dec;64:194–205.
45. Draget KI, Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*. 2011 Mar;25(2):251–6.
46. Remminghorst U, Rehm BHA. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*. 2006 Sep 25;28(21):1701–12.
47. Pawar SN, Edgar KJ. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*. 2012 Apr;33(11):3279–305.
48. Lertsutthiwong P, Noomun K, Jongaroonngamsang N, Rojsitthisak P, Nimmannit U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers*. 2008 Oct;74(2):209–14.
49. Alvarez-Lorenzo C, Blanco-Fernandez B, Puga AM, Concheiro A. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013 Aug;65(9):1148–71.
50. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010 Jan;62(1):3–11.
51. Ravi Kumar MN. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*. 2000 Nov;46(1):1–27.

52. LogithKumar R, KeshavNarayan A, Dhivya S, Chawla A, Saravanan S, Selvamurugan N. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. 2016 Oct;151:172–88.
53. Sinha V., Singla A., Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004 Apr;274(1–2):1–33.
54. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2011 Aug;36(8):981–1014.
55. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2004 Nov;100(1):5–28.
56. Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2010 Apr;56(3):290–9.
57. Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *Journal of Controlled Release*. 2012 Jul;161(2):496–504.
58. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006 Jul;31(7):603–32.
59. Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012 Aug;81(3):463–9.
60. Liu W, He G, Qian Z. Preparation of chitosan nanocapsules and their release properties. *Polymer Bulletin*. 2011 Oct;67(7):1237–44.
61. Chen C-K, Wang Q, Jones CH, Yu Y, Zhang H, Law W-C, et al. Synthesis of pH-Responsive Chitosan Nanocapsules for the Controlled Delivery of Doxorubicin. *Langmuir*. 2014 Apr 15;30(14):4111–9.
62. Feng W, Nie W, He C, Zhou X, Chen L, Qiu K, et al. Effect of pH-Responsive Alginate/Chitosan Multilayers Coating on Delivery Efficiency, Cellular Uptake and Biodistribution of Mesoporous Silica Nanoparticles Based Nanocarriers. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2014 Jun 11;6(11):8447–60.
63. Carballo-Pacheco M, Strodel B. Advances in the Simulation of Protein Aggregation at the Atomistic Scale. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2016 Mar 31;120(12):2991–9.
64. Knowles TPJ, Mezzenga R. Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials. *Advanced Materials*. 2016 Aug;28(31):6546–61.
65. Rambaran RN, Serpell LC. Amyloid fibrils: Abnormal protein assembly. *Prion*. 2008 Jul;2(3):112–7.
66. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as ‘Curecumin’: From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*. 2008 Feb;75(4):787–809.
67. Kunnumakkara AB, Bordoloi D, Padmavathi G, Monisha J, Roy NK, Prasad S, et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British Journal of Pharmacology*. 2016;174(11):1325–1348.
68. Shishodia S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Role of Curcumin in Cancer Therapy. *Current Problems in Cancer*. 2007 Jul;31(4):243–305.
69. Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Letters*. 2008 Oct;269(2):199–225.

70. Rahimi HR, Nedaeinia R, Shamloo AS, Nikdoust S, Oskuee RK. Novel delivery system for natural products: Nano-curcumin formulations. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2016 Jun;(4).
71. Pinto RJB, Marques PAAP, Barros-Timmons AM, Trindade T, Neto CP. Novel SiO₂/cellulose nanocomposites obtained by in situ synthesis and via polyelectrolytes assembly. *Composites Science and Technology*. 2008 Mar;68(3–4):1088–93.
72. Liu Y, Yang J, Zhao Z, Li J, Zhang R, Yao F. Formation and characterization of natural polysaccharide hollow nanocapsules via template layer-by-layer self-assembly. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012 Aug;379(1):130–40.
73. Silva NHCS, Pinto RJB, Freire CSR, Marrucho IM. Production of lysozyme nanofibers using deep eutectic solvent aqueous solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016 Nov;147:36–44.
74. Kim S, Philippot S, Fontanay S, Duval RE, Lamouroux E, Canilho N, et al. pH- and glutathione-responsive release of curcumin from mesoporous silica nanoparticles coated using tannic acid–Fe(III) complex. *RSC Advances*. 2015;5(110):90550–8.
75. Taebnia N, Morshedi D, Yaghmaei S, Aliakbari F, Rahimi F, Arpanaei A. Curcumin-Loaded Amine-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles Inhibit α -Synuclein Fibrillation and Reduce Its Cytotoxicity-Associated Effects. *Langmuir*. 2016 Dec 20;32(50):13394–402.
76. Gil PR, del Mercato LL, del_Pino P, Muñoz_Javier A, Parak WJ. Nanoparticle-modified polyelectrolyte capsules. *Nano Today*. 2008 Jun;3(3–4):12–21.
77. Peyratout CS, Dähne L. Tailor-Made Polyelectrolyte Microcapsules: From Multilayers to Smart Containers. *Angewandte Chemie International Edition*. 2004 Jul 19;43(29):3762–83.
78. Canfield RE. The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 1963 Aug;238(8).